



**Sílvia Lancha
Petronilho**

**Caracterização da fracção sesquiterpénica de
populações de camomila (*Matricaria recutita* L.).**



**Sílvia Lancha
Petronilho**

**Caracterização da fracção sesquiterpénica de
populações de camomila (*Matricaria recutita* L.).**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, realizada sob a orientação científica da Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

“Sinto-me nascido a cada momento
Para a eterna novidade do Mundo...”

Fernando Pessoa

o júri

presidente

Prof.^a Dr.^a. Ivonne Delgadillo Giraldo

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Dr.^a Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço (Orientadora)

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva (Co-orientador)

professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Dr.^a Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro Gaspar

professora auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

agradecimentos

Aos meus orientadores, Professora Doutora Sílvia M. Rocha e Professor Doutor Manuel António Coimbra, por todo o apoio, dedicação, coerência, paciência e disponibilidade, bem como pelos conhecimentos e conselhos partilhados.

Ao Professor Doutor Marcelo Maraschin, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo fornecimento das amostras e por toda a informação prestada.

Às alunas de doutoramento, Elisabete Coelho, Juliana Vinholes e Isabel Silva, por todo o apoio, ajuda, simpatia e pelo seu companheirismo.

Aos Professores, Doutor Jorge Saraiva e Doutor Carlos Silva, pela disponibilidade dos equipamentos de alta pressão e supercrítico, respectivamente, e pelos esclarecimentos prestados.

Ao Professor Doutor Armando Silvestre, pela disponibilidade e pelos esclarecimentos no âmbito de Química Orgânica.

Ao Doutor António Barros pela sua participação na resolução da análise multivariada dos resultados.

Aos alunos de doutoramento, Joel Olmos e Cláudia Passos, pelo apoio e ajuda prestados, com os equipamentos de alta pressão e do supercrítico

Aos colegas de curso e de mestrado pela amizade e pelos agradáveis momentos que partilhamos juntos.

Aos colegas do laboratório de investigação por proporcionarem um bom ambiente de trabalho.

Aos meus pais, pelo incentivo, dedicação e compreensão. O encorajamento e força que sempre me transmitiram foram preciosos.

Obrigada!

palavras-chave

Camomila (*Matricaria recutita* L.), micro-extracção em fase sólida, em modo de espaço de cabeça (HS-SPME), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com quadrupolo (GC-qMS), método de adição padrão, alta pressão isostática, extracção com CO₂ supercrítico.

resumo

A camomila (*Matricaria recutita* L.) pertence à família das *Asteraceae* e é considerada uma das mais importantes plantas medicinais. O consumo e interesse crescente pela camomila devem-se às suas propriedades medicinais, associadas à presença de compostos com actividade biológica, nomeadamente, sesquiterpenóides. O α -bisabolol é um dos principais sesquiterpenóides da camomila, ao qual estão associadas propriedades anti-inflamatórias, anti-fúngicas, anti-bacterianas, entre outras. A actividade terapêutica deste composto apresenta-se, também, bastante promissora no tratamento de tumores.

Com este trabalho foi, inicialmente, desenvolvida uma metodologia para a caracterização da fracção sesquiterpénica da camomila, por recurso à micro-extracção em fase sólida, em modo de espaço de cabeça, associada à cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa com quadrupolo (HS-SPME/GC-qMS). Para a realização de todo o trabalho foram usadas amostras de *M. recutita* L., provenientes de diferentes zonas geográficas, tipos de cultura e colheitas. Os resultados obtidos permitiram definir o perfil global em sesquiterpenóides. Foi, ainda, possível estabelecer o quimiotipo de cada população analisada. As populações estudadas pertencem ao quimiotipo do óxido de bisabolol B, com excepção da população B1. A metodologia de HS-SPME/GC-qMS desenvolvida foi usada para estimar a quantidade de α -bisabolol nas inflorescências de camomila pelo método de adição padrão. Seguiu-se uma fase exploratória de pesquisa de metodologias que permitiram obter extractos enriquecidos em sesquiterpenóides. Assim, testou-se a alta pressão isostática e a extracção com CO₂ supercrítico. Os resultados foram bastante promissores no que diz respeito à caracterização sesquiterpénica das inflorescências de camomila.

Finalmente, foram avaliados os potenciais efeitos biológicos dos componentes da camomila, tais como, o efeito anti-oxidante. Dos cinco padrões estudados, o *trans*- β -farneseno foi aquele que apresentou maior actividade antioxidante.

keywords

Chamomile (*Matricaria recutita* L.), headspace-solid phase microextraction (HS-SPME), gas chromatography-quadrupole mass spectrometry (GC–qMS), standard addition method, isostatic high pressure, supercritical fluid extraction with carbon dioxide.

abstract

The chamomile (*Matricaria recutita* L.) belongs to *Asteraceae* family and it is considered one of the most important medicinal plants. Consume and crescent interests in chamomile are due to its medicinal properties, associated to the presence of biological active compounds, namely sesquiterpenoids. The α -bisabolol is one of the principal sesquiterpenoids that are associated to anti-inflammatory, anti-fungic, anti-bacterial and other properties. Its therapeutical activity seems to be very promissory in the treatment of tumours.

This work first objective was the development of an analytical methodology for characterization of sesquiterpenoids composition of chamomile. For this purpose we used a headspace-solid phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry (HS-SPME/GC–qMS) methodology. Samples of *M. recutita* L. were from different types of cultures, geographic zones and harvest. The results obtained allowed the characterization of the sesquiterpenoids composition. The chemotype of each population was established. The studied populations belong to chemotype of bisabolol oxide B with exception of population B1. The HS-SPME/GC–qMS methodology was used for α -bisabolol quantification in inflorescences of chamomile by the standard addition method. The second objective is to verify if methodologies like isostatic high pressure and supercritical fluid extraction with carbon dioxide allowed to obtain sesquiterpenoid enrich chamomile extracts. The results were very promissory for the characterization of sesquiterpenoids composition of chamomile. In a third phase the potential antioxidant properties effects of the sesquiterpenoids compounds of chamomile were evaluated. For the five studied standards, *trans*- β -farnesene presents the highest antioxidant properties.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 <i>Matricaria recutita</i> L.	9
1.1.1 Características e propriedades medicinais.....	9
1.1.2 Composição das inflorescências e do óleo	10
1.1.3 Efeitos biológicos	13
1.1.4 Influência do tipo de cultura	14
1.2 Microextração em fase sólida e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (SPME/GC–MS)	15
1.2.1 Microextração em fase sólida.....	15
1.2.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria da massa (GC–MS)	22
1.3 Métodos para obtenção de um extracto enriquecido em sesquiterpenóides.....	24
1.3.1 Alta pressão isostática	24
1.3.2 Extração com CO ₂ supercrítico	26
1.4 Avaliação do poder antioxidante de sesquiterpenóides pelo método do DPPH*	28
1.4.1 Actividade antioxidante	28
1.4.2 Método do DPPH*	28
2. OBJECTIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Amostras de Camomila.....	37
3.2 Reagentes e Padrões	39
3.3 Revestimento da fibra de SPME	41
3.4 Equipamentos.....	42
3.5 Caracterização das amostras de <i>Matricaria recutita</i> L. por HS-SPME/GC–qMS.....	43
3.5.1 Extração por alta pressão isostática.....	43
3.5.2 Extração com CO ₂ supercrítico	44
3.5.3 Extração por HS-SPME	44
3.6 GC–qMS	45
3.7 Método DPPH*	46
3.7.1 Análise do comportamento cinético.....	46
3.7.2 Determinação do EC ₅₀	47
3.8 Tratamento de resultados.....	47
3.8.1 Metodologia de HS-SPME/GC–qMS.....	47
3.8.2 Método DPPH*	48
3.8.3 Determinação dos limites de detecção (LOD).....	49
3.8.4 Determinação dos limites de quantificação (LOQ)	49

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Caracterização da fracção sesquiterpénica de inflorescências de camomila por HS-SPME/GC–qMS	53
4.1.1 Perfil global em sesquiterpenóides.....	53
4.1.2 Estimativa do potencial biológico com base no teor total de sesquiterpenóides	60
4.2 Desenvolvimento de uma metodologia para quantificação do α -bisabolol.....	62
4.2.1 Análise directa das inflorescências – método de adição padrão.....	62
4.3 Metodologias para obtenção de extractos enriquecidos em sesquiterpenóides - Avaliação exploratória dos seus potenciais	66
4.3.1 Alta pressão isostática.....	63
4.3.2 Extracção com CO ₂ supercrítico	67
4.4 Avaliação do potencial antioxidante dos sesquiterpenóides da camomila	68
5. CONCLUSÕES	81
6. BIBLIOGRAFIA	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Matricaria recutita* L.

1.1.1 Características e propriedades medicinais

A camomila (*Matricaria recutita* L.) pertence à família das *Asteraceae* (2) e é considerada uma das mais importantes plantas medicinais (1). A camomila é uma planta de origem essencialmente selvagem, nativa do sudoeste da Europa e oeste da Ásia, que se espalhou por toda a Europa, América do Norte e Austrália. Recentemente, encontra-se, ainda, na América do Sul (10). Este incremento no cultivo da camomila deve-se ao elevado interesse apresentado pelas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar (3).

Na medicina tradicional, a camomila é usada para tratar úlceras, eczemas, gota, irritações da pele, neuralgia ciática, hemorróidas, mastites, conjuntivites, entre outras (4). Nos anos mais recentes, o consumo da camomila na forma de infusão tem-se tornado muito popular, sendo consumida em larga escala por todo o mundo (4). Na forma de infusão, a camomila tem sido, frequentemente, usada como sedativo, para reduzir a ansiedade e a histeria e, também, para minimizar problemas com o sono tais como insónias e pesadelos. Para além disto, as infusões de camomila também são usadas como anti-inflamatórios, anti-bacterianos, estimuladores do fígado e, ainda, como anti-micóticos (4).

O consumo e interesse crescente pela camomila devem-se às suas propriedades medicinais, associadas à presença de compostos com actividade biológica, que está associada às diferentes classes de compostos bioactivos (4), nomeadamente os sesquiterpenóides tais como o α -bisabolol e os seus óxidos; os azulenos como o camazuleno e, ainda, os derivados de acetileno (4). O α -bisabolol é um dos principais sesquiterpenóides da camomila, ao qual estão associadas propriedades anti-inflamatórias (1, 2).



Figura 1 - Capítulos florais de *Matricaria recutita* L. (7).

1.1.2 Composição das inflorescências e do óleo

As inflorescências de camomila apresentam na sua composição compostos hidrofílicos e lipofílicos, sendo estes responsáveis pelos efeitos conhecidos da camomila. Estas contêm, aproximadamente, 1,2% de apigeninas e 0,5% de óleos essenciais. Para além disto, as suas inflorescências são muito ricas em compostos fenólicos, como os flavonóides (4).

Os óleos essenciais extraídos das inflorescências de camomila, são compostos por elementos como o carbono, oxigénio e hidrogénio, sendo a sua classificação química difícil, visto serem formados por uma mistura de diversas moléculas orgânicas, como: hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outros (6). Nas plantas, os óleos apresentam-se em misturas de diferentes concentrações, tendo, normalmente, um composto maioritário. No entanto, a grande maioria é constituída por terpenóides (6).

Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo, esse termo, empregue para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno. Os compostos terpénicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos e os sesquiterpenos (1, 8).

As inflorescências de camomila contêm óleo essencial que apresenta na sua composição sesquiterpenóides cíclicos como o α -bisabolol e o camazuleno, a matricina (que é uma lactona sesquiterpénica, a partir da qual se forma o camazuleno), flavonóides (apigenina), aminoácidos, ácidos gordos, sais minerais, cumarinas como a herniarina e a umbeliferona, mucilagens e ácidos orgânicos (2, 4, 7). Contudo, os principais componentes do óleo da camomila são o α -bisabolol (1,3 – 60,1%), o óxido de bisabolol A (0,4 – 57,7%), o óxido de bisabolol B (0,2 – 50,5%), β -farneseno (0,3 – 13,8%), camazuleno (2,7 – 34,2%), α -farneseno (9,1 – 16,3%), óxido de bisabolona A (0,4 – 3,8%) e Δ -cadineno (2,2 – 0,8%) (7). Destes compostos podem salientar-se o α -bisabolol e o camazuleno, devido aos seus efeitos biológicos.

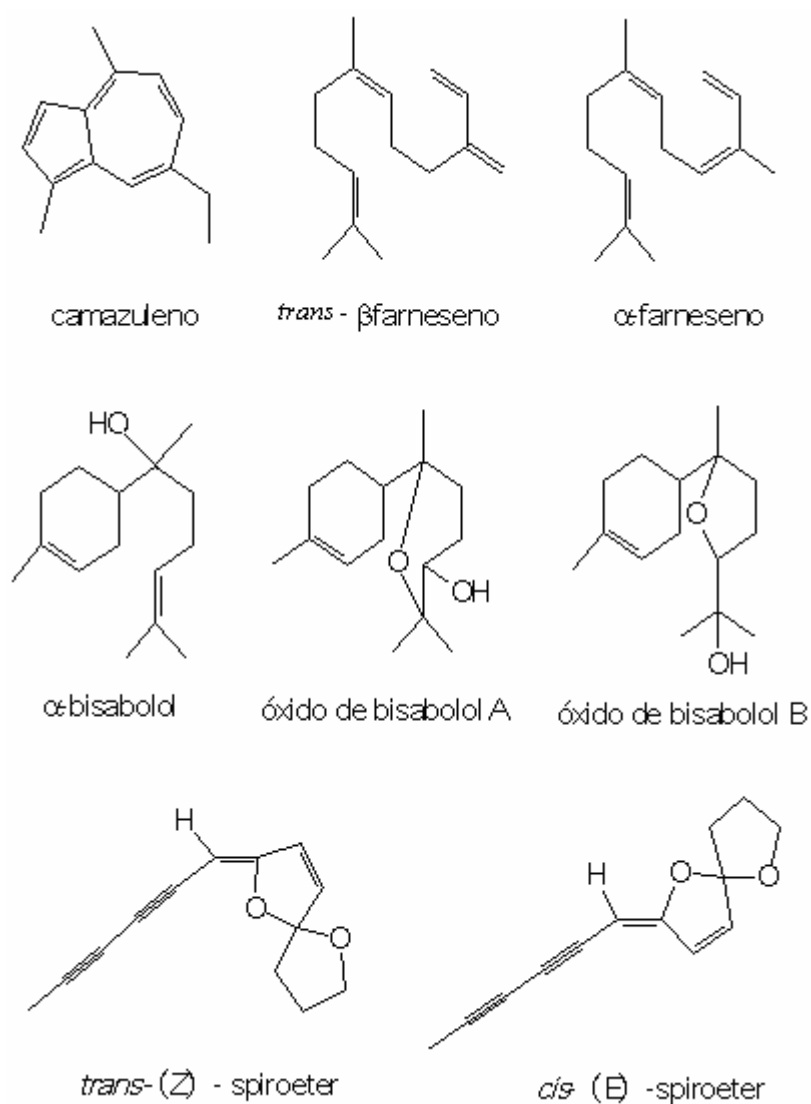


Figura 2 - Estruturas dos principais constituintes do óleo essencial de *Matricaria recutita* L. (9).

O α-bisabolol é um álcool sesquiterpénico bastante lipofílico com grande tendência para a oxidação (14). Os seus produtos de oxidação são, principalmente, os óxidos de bisabolol A e B (Figura 3) (14, 15).

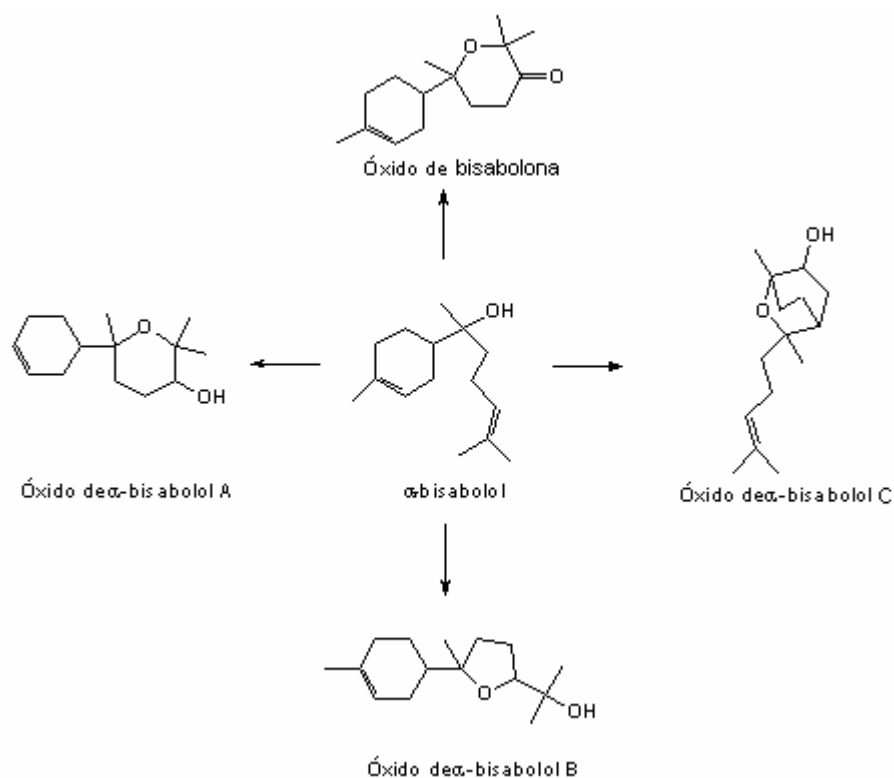


Figura 3 - Estrutura molecular do α -bisabolol e dos seus respectivos produtos de oxidação (15).

O camazuleno é um artefacto que se forma durante a destilação de vapor a partir da matricina (2, 13). O camazuleno é também, o responsável pela cor azul do óleo essencial de camomila (6) obtido por destilação de vapor. Durante o processo de destilação, parece ocorrer uma hidrólise da matricina para um intermediário ácido hidroxi-carboxílico, com perda de uma molécula de água originando ácido camazulénico. Em seguida, ocorre descarboxilação do grupo carboxilo, convertendo o ácido camazulénico em camazuleno (Figura 4) (13).

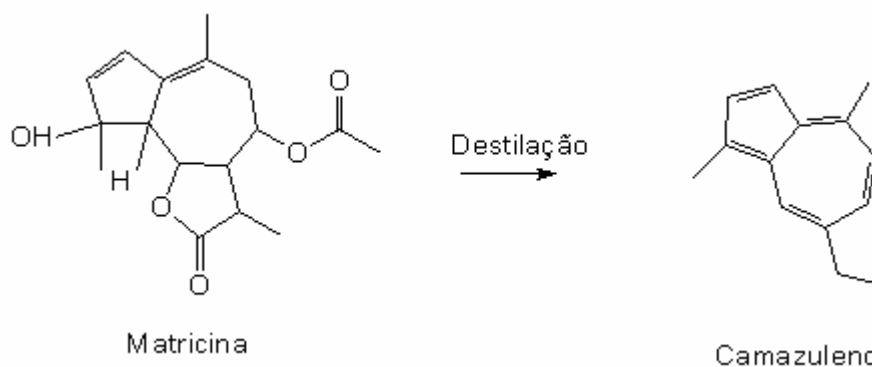


Figura 4 - Formação do camazuleno a partir da matricina durante a destilação de vapor (16).

As populações de camomila podem ser classificadas em quimiotipos distintos, conforme o conteúdo de determinados compostos: quimiotipo do α -bisabolol, quimiotipo do óxido de bisabolol A, quimiotipo do óxido de bisabolol B e quimiotipo do óxido de bisabolona, de acordo com os compostos, que possuem em maior quantidade (2). Estes quimiotipos são específicos de diferentes regiões e, por exemplo, se o teor do α -bisabolol for mais elevado do que o teor dos seus óxidos, essas regiões são do quimiotipo do α -bisabolol e, por isso, produzem um tipo de camomila mais desejável (2).

1.1.3 Efeitos biológicos

A camomila é usada como “erva remédio” devido à sua reputação como calmante, sedativo, anti-inflamatório e anti-séptico. Esta também é muito usada no tratamento de espasmos e de outras doenças do tracto gastrointestinal.

Dos compostos constituintes da camomila, podem-se salientar as propriedades anti-bacterianas, anti-fúngicas e anti-inflamatórias, do camazuleno e α -bisabolol (9, 11, 13). O α -bisabolol tem, ainda, actividade anti-ulcerosa e anti-séptica e, recentemente, têm sido feitos estudos para descrever também, a sua actividade anti-cancerígena, nomeadamente no tratamento do glioma, uma vez que este, *in vitro*, destrói rapidamente as suas células cancerígenas (11). Tal como o α -bisabolol, os seus produtos de oxidação, principalmente, os óxidos de bisabolol A e B (figura 3), apresentam também actividade anti-inflamatória, mas esta é cerca de 50% da do α -bisabolol (15).

O camazuleno, além das propriedades acima referidas, é também um poderoso antioxidante, inibindo a peroxidação lípidica (6).

1.1.4 Influência do tipo de cultura

As populações de camomila podem provir de dois tipos de cultura distintos, a cultura biológica e a cultura convencional. Na cultura biológica, as populações de camomila crescem sem recurso a fertilizantes químicos, pesticidas e promotores de crescimento, sendo a sua adubação feita por recurso a fertilizantes orgânicos (dejectos de animais, adubos verdes, húmus de minhoca, entre outros). Por outro lado, na cultura convencional recorre-se ao uso de fertilizantes químicos, de pesticidas e de promotores de crescimento.

A quantidade de sesquiterpenóides produzida, nomeadamente, aqueles que têm maior valor biológico, pode dever-se a uma ou à conjugação de várias condições específicas. Existem compostos que são produzidos, por exemplo, em resposta a determinado ataque à planta por parte de determinados microrganismos ou insectos, ou seja, são produzidos em condições de stress que favorecem a produção de determinados compostos, nomeadamente dos sesquiterpenóides (2). Além dos mecanismos de defesa, a produção de sesquiterpenóides pode depender do tipo de solo, da adubação, do meio-ambiente envolvente (flora e fauna vizinhas) e do clima (2).

A composição química da camomila muda à medida que a flor se vai formando e floresce. Durante este processo de desenvolvimento da planta, o conteúdo em compostos como a matricina, compostos de bisabolol e *trans*- β -farneseno é afectado, começando a diminuir em quantidade (2). Um factor considerado determinante para o aparecimento de sesquiterpenóides na camomila é o dia da colheita (2), em que, o centésimo dia após o surgimento da planta parece ser o mais produtivo para o óleo essencial, sendo possível associar, a sesquiterpenóides diferentes, dias distintos. Porém, é entre o 92º e 110º dia que se obtêm máximos de produção. Por exemplo, o α -bisabolol atinge o pico de produção cerca de 20 dias antes de ser atingido o pico produtivo dos óxidos de bisabolol A e B. Este facto revela-se importante para a clarificação da oxidação do bisabolol, pois poderia ser levantada a hipótese de ser uma reacção que ocorresse, exclusivamente, durante a extracção dos componentes voláteis, tal como no caso da matricina que se transforma em camazuleno (2).

1.2 Microextração em fase sólida e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (SPME/GC–MS)

1.2.1 Microextração em fase sólida

No início da década de noventa, J. Pawliszyn e colaboradores introduziram uma metodologia, desenvolvida a partir da técnica de extração em fase sólida (SPE) para análise de poluentes em água, a micro-extração em fase sólida – SPME (22).

A microextração em fase sólida (SPME) surgiu com a necessidade de se desenvolverem métodos analíticos simples e eficientes, para a monitorização e avaliação do meio ambiente, nomeadamente no que se relacionava com a análise de contaminantes orgânicos (23). SPME apresentou-se como uma alternativa aos métodos de extração líquido-líquido, extração em espaço de cabeça dinâmico e outras técnicas de extração (24). Trata-se de uma técnica de extração e de pré-concentração simultânea de compostos voláteis e semi-voláteis, sem o recurso a solventes (26).

Em SPME não ocorre uma extração exaustiva, dado que o sistema tende para um equilíbrio em que os analitos se distribuem pelas diferentes fases do sistema (24). Envolve uma fibra de sílica fundida revestida com uma fase estacionária (sólida, líquida ou mista) que é posta em contacto com a amostra (sistema de duas fases) ou introduzida no seu “espaço de cabeça” (sistema de três fases) (HS-SPME) (24). Após a partição dos analitos entre fases, em que, num sistema de duas fases, esta ocorre entre a amostra e a fase estacionária da fibra e que, num sistema de três fases, ocorre entre a amostra, o “espaço de cabeça” e a fase estacionária da fibra (Figura 5), os compostos sorvidos pela fase estacionária podem ser termicamente desorvidos no injector de um cromatógrafo de fase gasosa (GC), onde irão ser separados.

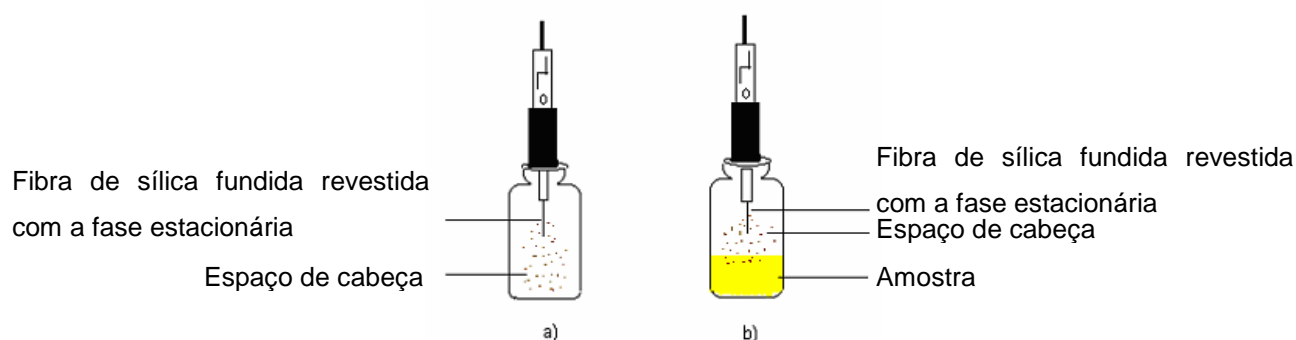


Figura 5 - Partição dos analitos entre fases: a) sistema de duas fases; b) sistema de três fases.

A simplicidade de manuseamento, a rapidez, a selectividade e a sensibilidade da SPME (11) e, também, o facto desta metodologia poder ser aplicada na análise da composição volátil de amostras sólidas, líquidas ou gasosas (25) tem motivado um crescente número de analistas na eleição desta metodologia (26). Uma outra vantagem é o facto desta metodologia permitir, também, analisar compostos responsáveis pelo aroma.

Os métodos convencionais, como por exemplo, a destilação a vapor ou a extracção directa com solventes, produzem extractos com uma composição volátil representativa da matriz líquida e não o espaço-de-cabeça. As moléculas presentes no espaço-de-cabeça são, na verdade, responsáveis pelo odor que é perceptível pelo sistema olfactivo, se estes estiverem em concentrações superiores aos limites de detecção sensorial.

○ Fase estacionária

Um dos aspectos críticos na optimização da SPME é a selecção do tipo de fibra específica para os compostos com interesse analítico (26). Existem vários tipos de fases estacionárias SPME (Tabela 1), estando a sua escolha dependente, quer da composição volátil da amostra que se pretende analisar, quer das condições experimentais. Por exemplo, o revestimento de PDMS com 100 µm de espessura de filme é, essencialmente seleccionado para a análise de compostos com características hidrofóbicas (27). Por outro lado, fibras à base de poliacrilato (PA) têm igualmente surgido no mercado, sendo mais adequadas na extracção de compostos hidrofílicos, devido à maior polaridade

do revestimento (26). Ainda outro tipo de fibras, cobrindo uma vasta gama de revestimentos, espessuras de filme e polaridades, têm sido desenvolvidas e actualmente, encontram-se disponíveis no mercado para as mais diversas aplicações (26).

Tabela 1 - Fases estacionárias disponíveis comercialmente para SPME.

Fase Estacionária	Espessura do filme (µm)	Temperatura máxima do injector do GC (°C)	Interação	Aplicação
PDMS	100 30 7	280 280 340	Absorção	Compostos orgânicos apolares, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, benzeno/tolueno/etilbenzeno/xileno, pesticidas organoclorados.
PDMS/DVB	65 60	270 270	Mista	Hidrocarbonetos aromáticos, aminas aromáticas.
CW/DVB	65	260	Mista	Compostos orgânicos polares tais como álcoois, cetonas, nitroaromáticos.
CX/PDMS	75	320	Mista	Hidrocarbonetos.
PA	85	320	Absorção	Compostos orgânicos polares tais como triazinas, pesticidas organofosforados e fenóis.

PDMS: Polidimetilsiloxano; **DVB:** Divinilbenzeno; **CW:** Carbowax; **CX:** Carboxen; **PA:** Poliacrilato.

Em SPME, as fibras apresentam como vantagem o facto de poderem ser reutilizadas, inúmeras vezes, dependendo no entanto, do tipo de aplicação a que as mesmas são sujeitas, da complexidade da matriz da amostra, das condições experimentais e dos cuidados no respectivo manuseamento (26).

No que se refere à interação entre a fase estacionária e os analitos extraídos da amostra, tal como se verifica na tabela 1, esta pode ser de absorção, adsorção ou mista (Figura 6). Contudo, independentemente da natureza desta interação, em ambos os casos, o processo de extracção inicia-se com a adsorção dos analitos, na superfície do revestimento das fibras. A migração destes para o interior do revestimento ou a sua permanência na superfície do revestimento, depende da magnitude do coeficiente de difusão do analito nesse revestimento (21), dependendo do tipo de fibra, numa fase posterior, poderá então ocorrer absorção ou adsorção.

Numa fase estacionária absorvente os analitos da amostra são extraídos para o seu interior ficando retidos pela fase estacionária (25). Neste caso, a capacidade de absorver determinada quantidade de analito, depende principalmente da espessura do filme e do tamanho do analito (25).

Numa fase estacionária adsorvente, os analitos são retidos à superfície de uma estrutura cristalina que pode apresentar poros de diferentes diâmetros, micro (2-20 Å), meso (20-500 Å) e macro (>500 Å), havendo deste modo, um número mais limitado de locais de sorção do que nas absorventes, o que pode provocar competição entre os analitos. Para concentrações de analito muito elevadas as fases estacionárias adsorventes ficam saturadas e a sua resposta deixa de ser linear (25). Assim, a interacção com os analitos por absorção permite uma melhor linearidade na resposta (gama de linearidade é 4x superior comparativamente com a interacção dos analitos por adsorção). Por sua vez, a interacção por adsorção permite uma maior sensibilidade (25).

Quanto à fase estacionária mista, como é o caso da CW/DVB, existe um efeito sinérgico de adsorção e absorção que promove uma capacidade elevada de retenção dos analitos por parte da fase estacionária, tornando-se deste modo, mais sensível que uma fase estacionária absorvente (28).

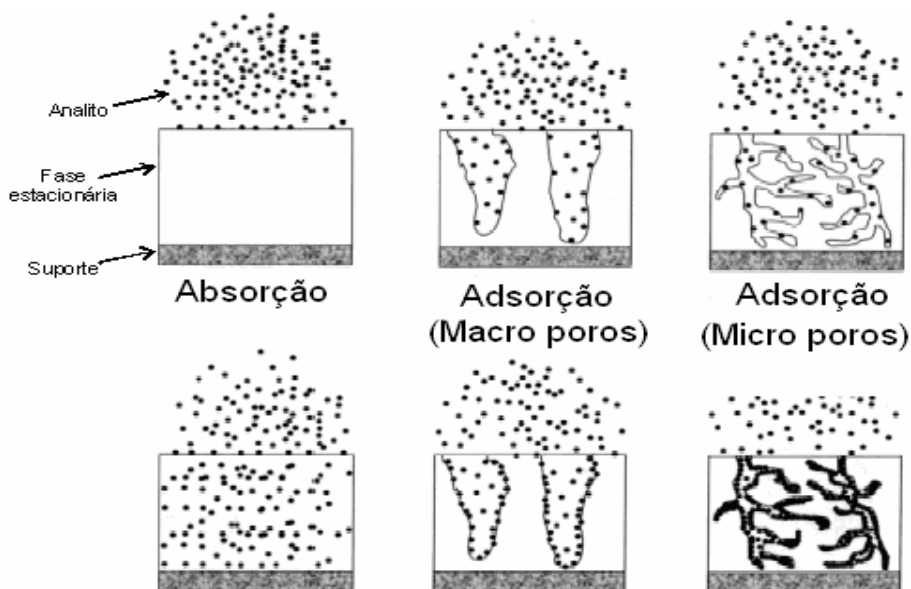


Figura 6 - Esquema representativo dos fenômenos de absorção e adsorção dos analitos pela fase estacionária da fibra de SPME (25).

Entre as mais variadas formas de exposição das fases estacionárias usadas em SPME, pode salientar-se o dispositivo que é usado na realização deste trabalho, no qual a fase estacionária se encontra protegida no interior de uma seringa (Figura 7). Esta seringa apresenta um êmbolo que permite expor e recolher a fase estacionária da fibra de SPME quando esta se encontra em contacto com a amostra em estudo ou no injector de um cromatógrafo.

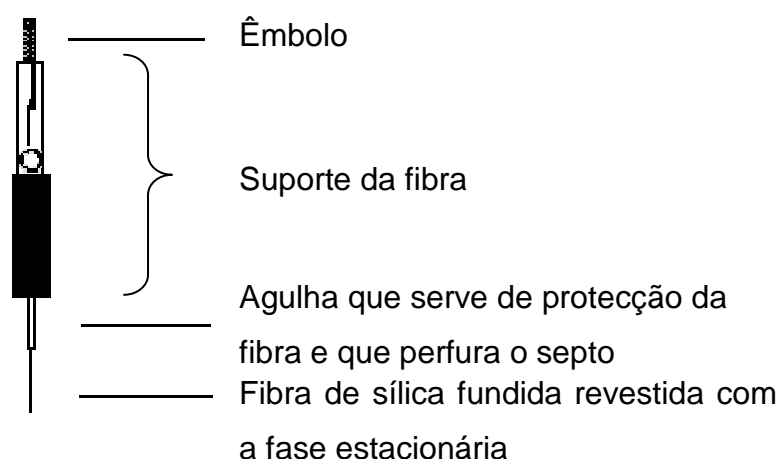


Figura 7 - Representação esquemática de uma seringa de SPME.

- Descrição e uso de um sistema de SPME

O equipamento usado para a aplicação da técnica de SPME é bastante simples. Consiste num suporte de fibra com revestimento de sílica fundida dentro de uma agulha de aço-inox. A agulha serve para fazer a injeção no injector de GC e no septo do frasco que contém a matriz da amostra. A extremidade da fibra encontra-se revestida por um filme de um polímero ou de um sólido adsorvente, consoante os tipos de famílias de compostos presentes na amostra (29), sendo que o revestimento da fibra usada no presente trabalho foi carbowax/divinilbenzeno.

Como esta técnica é baseada na sorção (adsorção ou desorção), a amostra sólida ou líquida é colocada num frasco selado com um septo, de seguida a amostra é termostatizada para que os compostos voláteis se libertem desta e passem para o espaço de cabeça ('headspace'), é então estabelecido um equilíbrio entre a fase que contém os componentes voláteis e a fase que contém a amostra (28). No entanto, nem sempre se trabalha em situação de

equilíbrio, sendo importante manter as mesmas condições experimentais para cada ensaio (29). Por exemplo, no presente trabalho não se trabalhou em situação de equilíbrio mas mantiveram-se as condições experimentais (quinze minutos de tempo de termostatização das amostras). Após termostatização da amostra, a agulha do suporte de SPME é inserida através do septo do frasco que contém a matriz de amostra, de seguida desce-se a fibra para o espaço de cabeça e, determinadas fibras, também podem ser imersas na matriz de amostra se esta for líquida. Os vapores do analito, compostos voláteis e semi-voláteis, são então sorvidos pela fibra - fase de extracção (29). Após a extracção, a fibra é recolhida para o interior da agulha, sendo altamente recomendável vedar a agulha (por exemplo transportá-la em conjunto com a amostra) aquando do seu transporte até ao cromatógrafo, de forma a evitar contaminações da fibra (30). De seguida, faz-se a injeção no GC-MS, onde ocorre a desorção térmica e transferência dos analitos para a coluna do GC, de acordo com um programa previamente seleccionado que controla a temperatura, a pressão do gás de arraste e o tempo. Os compostos dessorvidos são arrastados para a coluna, apresentando diferentes tempos de retenção e são identificados a partir da comparação do seu espectro de massa com os espectros de massa existentes na livreria do computador, com espectros de massa de padrões puros e, também, por comparação dos tempos de retenção (30).

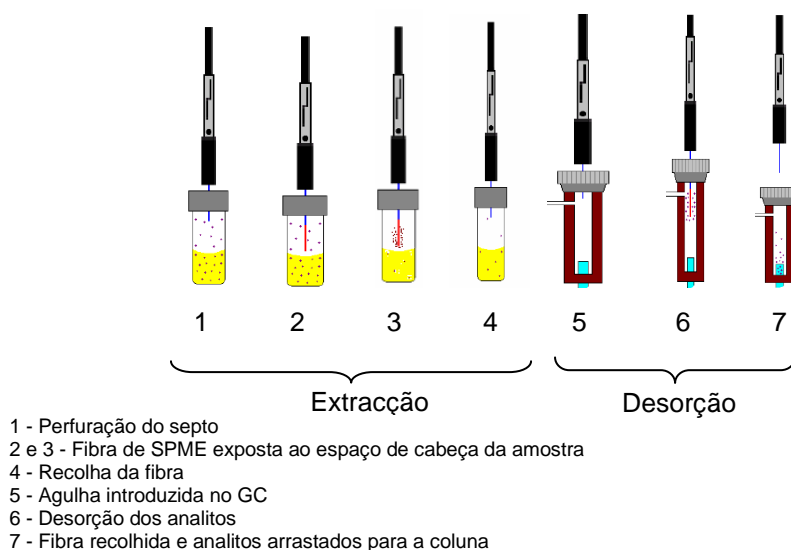


Figura 8 - Esquema explicativo do suporte de SPME nos processos de extracção e de desorção dos compostos voláteis (www.iac.sp.gov.br.pdf).

- Influência das condições experimentais

O equilíbrio de partição dos compostos voláteis entre o espaço-de-cabeça e a fibra de SPME é influenciado por várias condições experimentais, tais como o efeito do volume, da temperatura de extracção, da agitação, da composição da amostra e do tempo de extracção (31).

A razão volume de espaço-de-cabeça/ volume da amostra (β) é a razão entre o volume de gás e o volume de amostra, a qual pressupõe que tem de haver espaço suficiente para que os compostos se possam volatilizar para o espaço de cabeça, de forma a atingir o equilíbrio entre fases, para que haja uma boa sorção dos compostos à fibra (23).

No efeito da temperatura, ocorre o aquecimento da amostra que fornece energia ao sistema e faz com que as moléculas dos analitos ultrapassem as barreiras que os prendem à matriz da amostra. Com o aumento da temperatura há, também, aumento da pressão de vapor, facilitando a passagem dos analitos da fase aquosa para o espaço-de-cabeça, tornando o processo de transferência mais eficaz (31). No entanto, é preciso ter em atenção qual a temperatura mais adequada a usar, visto que, temperaturas elevadas provocam a formação de artefactos e, para além disso, também têm efeito sobre a solubilidade dos compostos na matriz (no caso de amostras líquidas) o que pode levar a uma menor eficácia no processo de transferência dos analitos para o espaço de cabeça. Quanto ao efeito da agitação, esta permite diminuir o tempo necessário para se estabelecer o equilíbrio dos componentes voláteis que constituem a amostra, facilitando, então, o transporte dos analitos da amostra até à fase estacionária. Deste modo, consegue-se tornar a extracção mais uniforme (23).

No efeito do tempo de extracção, sabe-se que, quanto maior for o período de extracção, isto é, o contacto da fibra com a matriz aquosa, maior será a quantidade de compostos extraídos até se atingir o equilíbrio (23). No entanto, isto não é uma situação linear visto que compostos mais voláteis necessitam de menores tempos de sorção do que compostos menos voláteis.

1.2.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria da massa (GC-MS)

A cromatografia em fase gasosa é uma forma particular, dentro do processo geral de separação, conhecido por cromatografia. Todas as formas de cromatografia envolvem a partição de compostos entre duas fases diferentes, transportados por intermédio de um veículo, a fase móvel, através de um meio, não miscível com o anterior, designado por fase estacionária, movendo-se a velocidades diferentes, consoante a sua solubilidade, o que tem como última consequência a sua separação física. Geralmente em cromatografia, como fase móvel usa-se azoto, hélio ou hidrogénio comprimido em cilindros (32). As condições de fluxo gasoso à entrada de um sistema de introdução de amostra (injector) são controladas por reguladores de pressão e válvulas de medição. A coluna é ligada ao sistema de injeção onde a amostra, geralmente é introduzida por meio de uma seringa. A outra extremidade da coluna é ligada a um sistema de detecção contínua do efluente da coluna, o detector. Este, deve ser insensível ao gás de arraste mas deve responder aos componentes eluidos da coluna. O registo da resposta do detector em função do tempo constituiu o cromatograma (32).

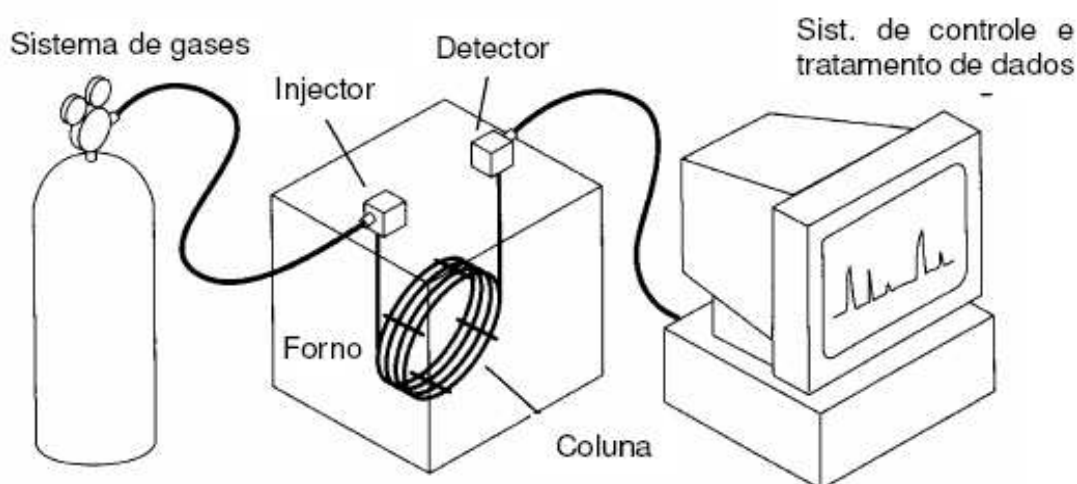


Figura 9 - Esquema de um cromatógrafo de gás.

O espectrómetro de massa, quando acoplado a um cromatógrafo de gás torna-se num detector com maior potencial que outros detectores, pois apresenta uma maior capacidade separativa, o que permite uma maior capacidade de identificação dos componentes de misturas complexas (32).

O uso da técnica de GC–MS, surge muitas vezes associado à técnica de SPME. Após a extracção da amostra, a fase estacionária da fibra de SPME sofre desorção térmica no injector de um cromatógrafo de fase gasosa e com o auxílio de um gás de arraste, a amostra atravessa uma coluna revestida interiormente com uma fase estacionária, onde os componentes da mistura vão sendo separados consoante a sua afinidade para a fase estacionária da coluna (33). Um componente com pouca afinidade para a fase estacionária elui rapidamente (33). Ao chegarem ao espectrómetro de massa do tipo quadrupolo, as moléculas são ionizadas sob vácuo, formando-se um grupo de iões com diferentes razões massa/ carga (m/z) que são separados pela interacção de campos eléctricos e posteriormente detectados (33). O espectrómetro de massa do tipo quadrupolo mede a razão m/z de iões em fase gasosa e a sua abundância. É possível controlar os iões que atingem o detector pela variação do campo eléctrico do sistema envolvido neste tipo de detector (33). Cada composto apresenta uma fragmentação característica que, para um mesmo tipo de detector, só é dependente da energia dos electrões ionizantes e da temperatura a que ocorre a ionização (33).

Os espectrómetros de massa com quadrupolo são particularmente adequados para o trabalho com GC–MS, devido à sua elevada sensibilidade (32). Dos cromatogramas que se obtêm é possível retirar não só informação qualitativa, que está relacionada com o tempo de retenção característico de cada componente, mas também, informação quantitativa referente às áreas cromatográficas dos picos (33). A cada ponto do cromatograma está associado um espectro de massa. Neste é estabelecida a relação entre a razão m/z dos iões detectados e a abundância de cada espécie iónica. Instrumentos devidamente calibrados apresentarão todos os mesmos iões aos mesmos valores de m/z (33).

1.3 Métodos para obtenção de um extracto enriquecido em sesquiterpenóides

1.3.1 Alta pressão isostática

A alta pressão é uma técnica normalmente usada para a produção de cerâmicas, materiais compostos, diamante artificial, plásticos, sendo, actualmente, também usada na indústria alimentar para pressurizar alimentos (36), tais como, sumos de fruta, ostras e fiambre (37). Este método de processamento de alimentos caracteriza-se pelo facto de a alta pressão ser aplicada uniformemente ao alimento, designando-se, por isso, de alta pressão isostática.

De acordo com Pascal ou com o princípio isostático, a pressão é transmitida, uniforme e imediatamente, através do meio de transferência de pressão ao produto alimentar, voltando este à forma inicial quando a pressão deixa de ser exercida, sendo assim os efeitos da pressão independentes do tamanho e da geometria do produto (36).

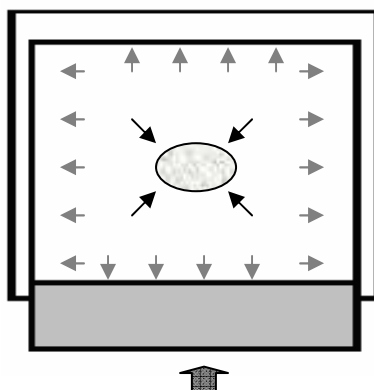


Figura 10 - Representação esquemática do princípio do processamento isostático (48).

O processo descontínuo de alta pressão isostática compreende três passos: aumento da pressão exercida, manutenção da pressão durante algum tempo e despressurização (36). A alta pressão pode ser obtida através da utilização de dois sistemas distintos de pressurização: compressão directa ou compressão indirecta. Na compressão directa, o produto que está no interior do recipiente é pressurizado directamente com um pistão, o qual possui um diâmetro pequeno. A parte superior do pistão, que possui um diâmetro maior, é movida através de uma bomba de baixa pressão. Devido a esta configuração

mecânica e à compressão rápida, o método em questão é apenas utilizado em laboratórios. Na compressão indirecta, há um intensificador de pressão que bombeia o fluído através de um sistema de tubos, para que este chegue ao recipiente. Este mecanismo ocorre até que a pressão exercida seja a pretendida (36). Esta técnica apresenta várias aplicabilidades ao nível da indústria alimentar, visto que, à temperatura ambiente, a aplicação de pressões na ordem de 400-600 MPa provoca a inactivação de células microbianas vegetativas, que leva à destruição da membrana celular, pela desnaturação de proteínas e também pela diminuição do pH do meio intracelular, sugerindo assim, que a aplicação da pressão resulta na inactivação das enzimas ligadas à membrana celular (37). Deste modo, resulta um produto pasteurizado que pode ser armazenado a 4-6 °C, durante um período de tempo considerável (37). Estudos mais recentes, mostram que a esterilização dos produtos alimentares por alta pressão, provoca não só a inactivação de células vegetativas, mas também a inactivação de esporos, resultando assim um produto bastante estável (38, 39). Para além disto, a aplicação de altas pressões tem surgido, também, como uma técnica para preparação de amostras, visto que esta permite aumentar a extractabilidade dos componentes de uma amostra, devido à alteração da estrutura dos sistemas alimentares (38).

Durante os tratamentos de alta pressão, ocorrem alterações nas células dos biopolímeros (proteínas, polissacarídeos e lípidos). A pressão induz alterações nos polissacarídeos e nas estruturas das proteínas (desdobramento, agregação, gelificação) e cristalinização de gorduras, que podem afectar a funcionalidade e textura/estrutura dos produtos alimentares. As alterações estruturais que ocorrem nos produtos vegetais, durante o processo de alta pressão, estão relacionados com alterações físicas, físico-químicas e (bio)químicas, que podem ocorrer na morfologia dos tecidos, nas células dos organelos e nas membranas, incluindo alterações a nível molecular. No entanto, estes efeitos estão muito dependentes do tipo de tecido e das condições de tratamento (temperatura, pressão e tempo de tratamento) dos produtos alimentares em questão (39, 40). As alterações na estrutura/textura das células vegetais, durante os tratamentos de alta pressão, ficam a dever-se, essencialmente há disrupção dos tecidos e há alteração na permeabilidade das membranas celulares (39, 40).

Existem estudos que mostram que há uma boa relação entre a firmeza e a percentagem de ruptura das células. O aumento da ruptura das células devido à alta pressão, diminui a firmeza e causa amolecimento dos tecidos (39, 40). Tudo isto leva a que o conteúdo celular seja libertado, aumentando deste modo a extractabilidade dos compostos constituintes de um produto alimentar.

1.3.2 Extracção com CO₂ supercrítico

A extracção com fluidos supercríticos (SFE) é uma tecnologia inovadora e de elevado potencial industrial e comercial que tem como principal área de aplicação, a nível mundial, a indústria do café.

Como, normalmente, as substâncias utilizadas no processo são gases inertes a baixas temperaturas e pressões, os fluidos supercríticos são considerados mais “amigos do ambiente” que os solventes orgânicos habituais (42). Além disso, os tempos de extracção são muito inferiores relativamente aos processos de extracção tradicionais, como por exemplo, a destilação por arrastamento de vapor (41). A destilação por arrastamento de vapor, usada para obtenção do óleo essencial de plantas pertencentes à família *Asteraceae*, como por exemplo, a camomila, pode levar à degradação térmica ou à hidrólise parcial de alguns compostos do seu óleo essencial. No entanto, a extracção com CO₂ supercrítico pode ser realizada a temperaturas que rondam os 40 °C, preservando, assim, a composição e as propriedades originais do óleo (41, 44).

O estado de fluido supercrítico é atingido quando se eleva a temperatura e a pressão de uma substância acima do seu ponto crítico (Figura 11). Os fluidos supercríticos exibem propriedades físico-químicas intermédias entre gases e líquidos. Perto do ponto crítico, os fluidos supercríticos possuem densidades semelhantes aos líquidos, o que lhes confere um elevado poder de solvatação; e propriedades de transporte como os gases, o que facilita os processos de transferência de massa, visto que a sua viscosidade é baixa e a sua difusibilidade é elevada (42). Dentro da região supercrítica, a capacidade de dissolução dos fluidos é sensível a suaves variações nas condições operacionais sendo possível manipular a capacidade de solvente, durante um processo de extracção, variando a pressão e a temperatura (42).

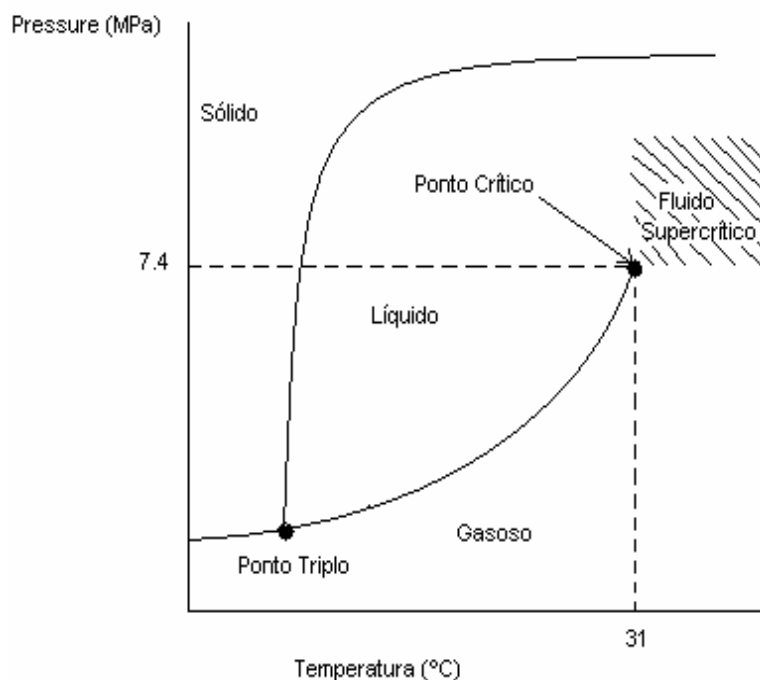


Figura 11 - Diagrama de fases do CO₂ (42).

O fluido mais utilizado é o CO₂ por ser fácil de obter e de trabalhar em processos industriais já que as suas condições críticas são seguras e relativamente fáceis de atingir (ponto crítico: 31,04 °C; 7,4 MPa) (41). É um solvente que não apresenta toxicidade, não é inflamável, não é poluente, é relativamente barato, é reciclável e é inerte, o que faz com que este possa ser usado na indústria alimentar (44). O CO₂ supercrítico é selectivo para compostos orgânicos de baixa polaridade e de baixo peso molecular e para substâncias muito voláteis (43). As baixas temperaturas de operação permitem que as extracções sejam conduzidas a uma temperatura suficientemente baixa para que não haja alteração das propriedades organolépticas e químicas dos extractos. Variando a temperatura e pressão, o CO₂ pode assumir propriedades de solvente semelhantes a uma vasta gama de solventes convencionais, desde o pentano à piridina (42).

Os custos associados a este processo são em geral elevados, no entanto o aumento da qualidade associada aos extractos resultantes, permite na maioria dos casos compensar os custos de produção, tornando assim, o processo rentável (43).

1.4 Avaliação do poder antioxidante de sesquiterpenóides pelo método do DPPH^{*}

1.4.1 Actividade antioxidante

O uso de antioxidantes remonta aos anos quarenta do século vinte. Inicialmente, eram usadas substâncias naturais mas que rapidamente foram substituídas por compostos sintéticos por apresentarem maior actividade antioxidante e por serem mais facilmente obtidos. Porém, em anos mais recentes, os antioxidantes naturais tornaram-se preferidos pelos consumidores e pelos produtores, devido ao aumento da preocupação com a segurança no uso de antioxidantes sintéticos (45).

Os antioxidantes naturais presentes em plantas usadas como alimento, recentemente, têm tido uma especial atenção devido ao seu presumível papel na protecção do corpo humano contra uma variedade de doenças degenerativas (46). Os antioxidantes desempenham um papel crucial na prevenção ou redução da auto-oxidação e têm tido também muita atenção como aditivos alimentares. Tanto os antioxidantes sintéticos como os naturais, são largamente usados em produtos alimentares, numerosos artigos científicos têm sido publicados e diversas patentes foram concedidas para a aplicação de antioxidantes e para a síntese e descoberta de novos antioxidantes (46).

Dada a importância deste tema, torna-se interessante avaliar o potencial antioxidante de alguns padrões de sesquiterpenóides identificados nas inflorescências de camomila. Para se observar o comportamento antioxidante de alguns padrões de sesquiterpenóides adoptou-se o método do DPPH^{*}.

1.4.2 Método do DPPH^{*}

O método do DPPH^{*} baseia-se na reacção entre o radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH^{*}) em solução de metanol com um composto antioxidante ou com outro qualquer composto com o objectivo de avaliar o seu poder antioxidante.

Na sua forma radicalar, o DPPH[•] absorve a 515 nm, apresentando uma cor violeta, mas com a acção redutora de um antioxidante (AH) ou um radical (R[•]) (Figuras 12), essa absorvância vai diminuindo ou desaparece, consoante o poder antioxidante do composto.

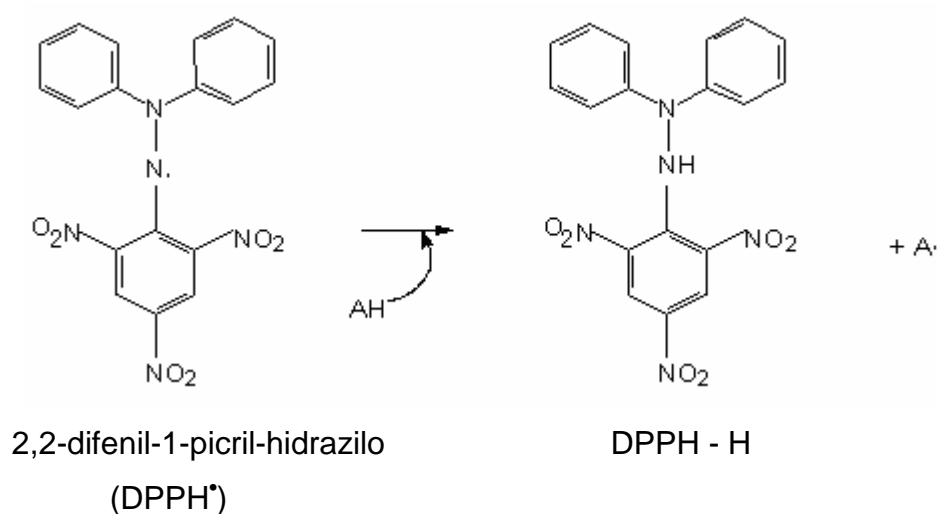
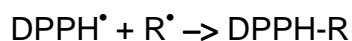
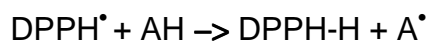


Figura 12 - Reacção do DPPH[•] com um antioxidante que forma um radical.

Na maioria dos casos, o grupo funcional que cede o protão ao radical é o grupo hidroxilo (-OH) do antioxidante (Figura 13).

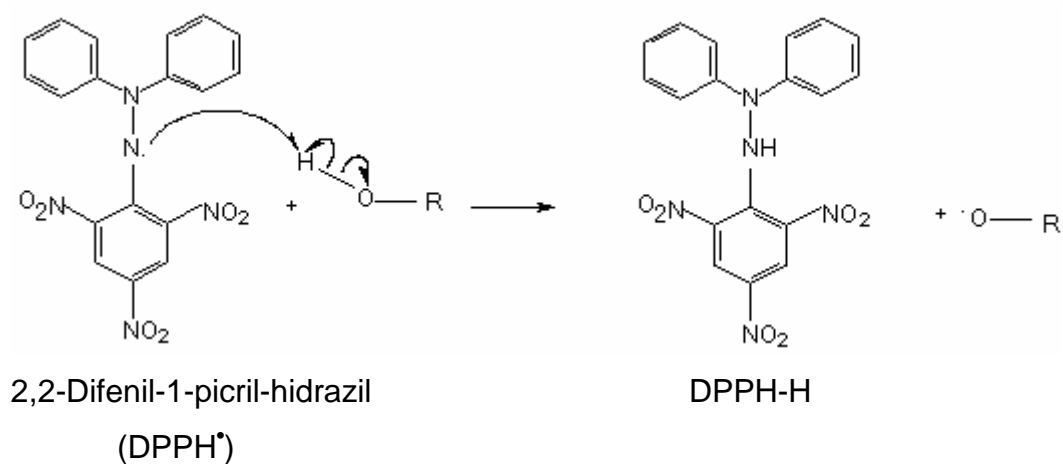


Figura 13 - Reacção entre o radical DPPH[•] e o grupo hidroxilo de um composto.

Em termos de reacção química, o átomo de azoto do DPPH[•] que contém o electrão desemparelhado, ataca o hidrogénio do(s) grupo(s) hidroxilo(s) (-OH), captando para si, um protão e um electrão da ligação O-H e formando uma nova ligação com o átomo capturado. O oxigénio do grupo hidroxilo do antioxidante fica então com o electrão desemparelhado, podendo, ainda, ocorrer rearranjos, tais como, formação de duplas ligações no oxigénio ou formação de estruturas de ressonância. Através do método do DPPH[•], conseguem-se analisar comportamentos cinéticos de vários compostos através da adição de uma determinada quantidade de cada composto em estudo à solução de DPPH[•] e observam-se as variações das absorvâncias do meio reaccional.

Com a redução do radical a DPPH-H por parte do padrão, a absorvância vai diminuindo até atingir um valor constante, altura em que se considera que a reacção atingiu a estabilidade. Quanto maior for a diminuição da absorvância, menor será a percentagem de DPPH[•] restante no meio e maior o poder antioxidante do composto.

Para cada composto em estudo é então obtido um gráfico % DPPH[•] restante vs tempo representativo da reacção cinética ocorrida. A % DPPH[•] restante é calculada considerando a absorvância do branco igual a 100% de DPPH[•] restante. Assim, através do tipo de comportamento cinético observado, pode caracterizar-se um composto em termos de cinética rápida, intermédia ou lenta. Uma cinética rápida traduz-se num composto que reage rapidamente com o DPPH[•] e atinge o estado estacionário em menos de cinco minutos. Os compostos que apresentam tempos de estabilização entre cinco e trinta minutos possuem uma cinética intermédia, enquanto que, os que demoram mais de trinta minutos, possuem uma cinética lenta (50).

2. OBJETIVOS

A camomila, sendo uma das plantas mais utilizadas em todo o mundo devido às suas propriedades medicinais, associadas à presença de compostos com actividade biológica, nomeadamente sesquiterpenóides, é por isso, alvo de estudo neste trabalho.

A metodologia normalmente usada para estabelecer o valor biológico da planta e, conseqüentemente, o seu valor comercial, envolve uma destilação por arrastamento de vapor das inflorescências para obtenção do óleo, seguida da sua caracterização química. Esta metodologia, apesar de indirecta, dado que em muitas aplicações terapêuticas são usadas directamente as inflorescências e não o óleo, é também morosa. Assim, com este trabalho, inicialmente, pretende-se desenvolver uma metodologia para a determinação da composição sesquiterpénica da camomila directamente nas inflorescências, por recurso à micro-extracção em fase sólida (CW/DVB), em modo de espaço de cabeça, associada à cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa com quadrupolo (HS-SPME/GC–qMS). Foram usadas amostras de inflorescências de *M. recutita* L., provenientes de diferentes zonas geográficas, tipos de cultura e colheitas. Considerando o potencial farmacológico e/ou fitoterapêutico da camomila, a implementação desta metodologia pode representar um avanço muito importante na caracterização e controlo de qualidade deste material vegetal. A metodologia de HS-SPME/GC–qMS desenvolvida, foi também usada para estimar a quantidade de α -bisabolol nas inflorescências das populações de camomila, segundo o método de adição padrão.

Segue-se uma fase exploratória de pesquisa de metodologias que permitam obter extractos enriquecidos em sesquiterpenóides, por recurso à alta pressão isostática e a extracção com CO₂ supercrítico.

Finalmente, pretendeu-se avaliar potenciais efeitos biológicos dos componentes da camomila, tais como, o efeito anti-oxidante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de Camomila

No presente trabalho, utilizaram-se inflorescências de camomila secas, da espécie *Matricaria recutita* L. As amostras são provenientes de diferentes Estados do Brasil com exceção das amostras Pró-Vida (C5) e Em Forma (B4), que foram adquiridas num comércio local. Na tabela 2, estão enumeradas algumas características de cada amostra, nomeadamente, a zona de cultivo, a data de colheita e o tipo de cultura.

Tabela 2 - Características das amostras de camomila utilizadas.

<i>Matricaria recutita</i> L.			
Código	Origem	Data de Colheita	Tipo de Cultura
Cam. Orgânica (B1)	Petrolândia, Santa Catarina	Outubro 2005	Biológica
C. Chilena (B2)	Curitiba, Paraná	Outubro 2005	Biológica
C. CWB (B3)	Curitiba, Paraná	Outubro 2005	Biológica
C. Em Forma (B4)	— *	—	Biológica
C. PR (B5)	Guarapuava, Paraná	Outubro 2007	Biológica
C. Rebouças(B6)	Quitandinha, Paraná	Setembro 2007	Biológica
C. ANG (B7)	Angelina, Santa Catarina	Novembro 2007	Biológica
C. Phyto (C1)	Curitiba, Paraná	Novembro 2005	Convencional
C. Chinesa (C2)	Curitiba, Paraná	Novembro 2005	Convencional
C. RE (C3)	Curitiba, Paraná	Novembro 2005	Convencional
C. NT (C4)	Curitiba, Paraná	Novembro 2005	Convencional
Pró-vida (C5)	—	—	Convencional
C. Tv (C6)	Mandirituba, Paraná	Setembro 2007	Convencional
C. R (C7)	Araucária, Paraná	Setembro 2007	Convencional
C. CC (C8)	Chapecó, Santa Catarina	Outubro 2007	Convencional

*-não disponível

Através da leitura da tabela, constata-se que as amostras provêm de dois tipos de cultura, a biológica e a convencional, cujas colheitas foram feitas em dois anos diferentes (2005 e 2007), no período de Setembro a Novembro, uma

vez que estes são os meses que reúnem melhores condições climáticas para a sua colheita.

No mapa apresentado em baixo, é possível fazer a localização geográfica das diferentes zonas de cultivo para cada população de camomila.

Brasil – Região Sul



Figura 14 - Localização geográfica das populações obtidas a partir da região Sul do Brasil.

3.2 Reagentes e Padrões

Para a realização da curva de calibração, que permitirá quantificar o α -bisabolo, prepararam-se soluções padrão de α -bisabolol ($\geq 95\%$ GC, Fluka) em metanol (99 % puro, Fluka), com as seguintes concentrações: 6,695, 3,511 e 1,518 $\mu\text{g/L}$.

Para a realização da curva de calibração para o DPPH $^{\bullet}$, prepararam-se soluções padrão de DPPH $^{\bullet}$ (Sigma) em metanol (99% puro, Fluka), com as seguintes concentrações: 96,37, 76,13, 61,68, 49,15, 38,55, 31,80, 26,02 $\mu\text{mol/L}$.

Os compostos analisados, pelo método DPPH $^{\bullet}$, quanto ao seu poder antioxidante foram: aromadendreno ($\geq 97\%$, Fluka), α -bisabolol ($\geq 95\%$ GC, Fluka), *trans*- β -farneseno ($\geq 90\%$ GC, Fluka), α -cedreno ($\geq 99\%$ GC, Fluka) e o *trans*-cariofileno ($\geq 98,5\%$ GC, Fluka). Nas tabelas 3 e 4 encontram-se algumas características físico-químicas destes padrões.

Tabela 3 - Fórmula e estrutura química dos padrões em estudo.

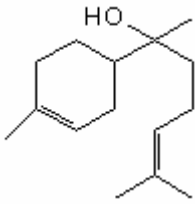
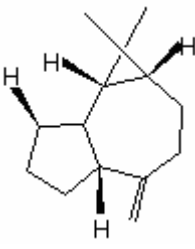
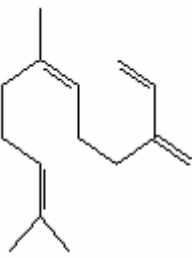
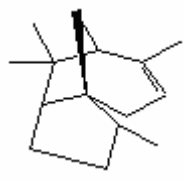
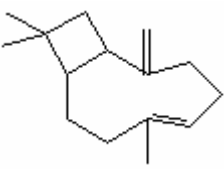
Composto	Estrutura Química
α -bisabolol $C_{15}H_{26}O$	
aromadendreno $C_{15}H_{24}$	
<i>trans</i> - β -farneseno $C_{15}H_{24}$	
α -cedreno $C_{15}H_{24}$	
<i>trans</i> -cariofileno $C_{15}H_{24}$	

Tabela 4 - Dados físico-químicos dos padrões em estudo (<http://encyclopedia.thefreedictionary.com> e <http://www.thegoodscentscompany.com/allprod.html>).

Composto	MM (g/mol)	d (g/cm ³)	p. e. (°C) (760mmHg)	Solubilidades
α -bisabolol C ₁₅ H ₂₆ O	222,37	0,929	314-315	Solúvel em álcoois e parafina Pouco solúvel em água
aromadendreno C ₁₅ H ₂₄	204,36	0,912	258-259	Solúvel em álcoois Pouco solúvel em água
<i>trans</i> - β -farneseno C ₁₅ H ₂₄	204,35	0,841	260-262	Muito solúvel em acetona, éter etílico e clorofórmio. Solúvel em álcoois Pouco solúvel em água
(-)- α -cedreno C ₁₅ H ₂₄	204,36	0,932	261-262	Solúvel em álcoois Pouco solúvel em água
<i>trans</i> -cariofileno C ₁₅ H ₂₄	204,36	0,902	260-261	Muito solúvel em benzeno. Solúvel em álcoois Pouco solúvel em água

MM - massa molecular, d - densidade, p.e. - ponto de ebulição

3.3 Revestimento da fibra de SPME

Para a realização deste trabalho foi utilizado um suporte manual de SPME da Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA). A fibra utilizada foi Carbowax/Divinilbenzeno (CW/DVB), também da Supelco, cuja fase estacionária tem uma espessura de 65 μ m. Esta fibra é constituída por um revestimento misto, ou seja, contém um polímero líquido e partículas sólidas. Este tipo de revestimento combina as propriedades de absorção do polímero líquido com as propriedades de adsorção das partículas porosas. O efeito sinérgico de adsorção e de absorção para com a fase estacionária promove uma elevada capacidade de retenção e, consequentemente, uma sensibilidade

mais elevada do que as fibras de absorção. As fibras CW/DVB são recomendadas para a extracção de álcoois e de compostos polares (28). A fibra CW/DVB foi condicionada a uma temperatura de 220°C durante duas horas no injector de GC, ou seja, o tempo de condicionamento foi superior ao recomendado pelo fabricante (30 minutos).

3.4 Equipamentos

Durante este trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- GC-qMS:

- A identificação e a quantificação dos compostos em estudo foram realizadas num cromatógrafo em fase gasosa Agilent Technologies 6890N Network, acoplado a um espectrómetro de massa Agilent 5973 (quadrupolo). Foi usado um liner de vidro de 0,75mm de diâmetro interno. O GC estava equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-FFAP com dimensões 0,30 m x 0,32 mm e um filme de 0,25 µm de espessura.

- Alta pressão isostática:

- Para obtenção de extractos enriquecidos em sesquiterpenóides, foi utilizado um equipamento de alta pressão High Pressure System U33, Unipress Equipment Division, cujo número de série é 1139/06, a pressão máxima é 700 MPa, a gama de temperaturas é de -20 a 100 °C, o volume é de 100 mL e a voltagem é 230V/1,5 kW. Este equipamento apresenta um sistema de pressão e um banho térmico que garantem a pressão e temperatura de trabalho.

- Extracção com CO₂ supercrítico:

- Quanto ao equipamento de extracção supercrítica foi utilizado, um equipamento desenhado, montado e testado no Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Este é formado por três zonas distintas: uma zona de compressão, uma zona comprimida (estado supercrítico) e uma zona de descompressão. A zona de compressão é constituída por uma garrafa de CO₂ (cerca de 60 bar e de pureza 99,5%), por um banho de refrigeração e por uma bomba (Haskel, modelo MCPV-71). A zona comprimida inclui uma

serpentina de aquecimento associada a um extractor (cerca de 100 mL). Por último, na zona de descompressão, a pressão é reduzida ao passar por um conjunto de válvulas. O produto final é obtido na zona de descompressão, dentro de um vaso de recolha. O controlo da pressão à entrada e à saída do extractor é feito através de duas válvulas reguladoras de pressão, uma de alta pressão (40 MPa max.) e uma de média pressão (15 MPa max.).

- Espectrofotómetro UV-Visível:

- Para a avaliação do potencial antioxidante, foi utilizado o espectrofotómetro Shimadzu UV - 160^a (UV - Visible Recording Spectrophotometer).

3.5 Caracterização das amostras de *Matricaria recutita* L. por HS-SPME/GC-qMS

3.5.1 Extracção por alta pressão isostática

Para estudar o efeito da pressão para a obtenção de extractos enriquecidos em sesquiterpenóides, pesaram-se 3,4 g de amostra de camomila para um saco concebido para ser pressurizado no equipamento de alta pressão. Os sacos foram selados, cuidadosamente, de modo a reduzir ao mínimo a quantidade de ar no seu interior. De seguida, este foi sujeito a uma pressão de 400 MPa durante 10 minutos, a uma temperatura de 20°C. Posteriormente, as amostras foram analisadas por HS-SPME/GC-qMS. Também se analisou uma amostra de camomila previamente hidratada com 30 mL de água ultra pura, cuja massa também era 3,4 g, sendo esta também sujeita a alta pressão, segundo o procedimento referido acima.



Figura 15 - Equipamento de alta pressão isostática utilizado.

3.5.2 Extracção com CO₂ supercrítico

Pesaram-se 15,0 g de amostra de camomila para um extractor de capacidade 100,0 mL. Em seguida a amostra foi sujeita a uma pressão de 20 MPa, a uma temperatura isostática de 40 °C (44). Para a lavagem da linha foi utilizado etanol absoluto puro, obtendo-se no final um extracto etanólico. Para a concentração do extracto recorreu-se ao uso de um evaporador rotativo. A análise da composição das amostras foi efectuada por HS-SPME/GC-qMS.

3.5.3 Extracção por HS-SPME

Esta metodologia foi usada para estudar o perfil em sesquiterpenóides das inflorescências de camomila, assim como, para avaliar o efeito de tempo de armazenamento das mesmas, através do estudo de amostras colhidas no mesmo ano mas analisadas em momentos de diferentes. Foi, ainda, usada para estimar o teor de α -bisabolol directamente nas inflorescências e para analisar os extractos obtidos, após estes serem sujeitos a alta pressão isostática e extracção com CO₂ supercrítico.

Para a extracção dos compostos voláteis das amostras de camomila, pesaram-se 2,0 g de inflorescências de camomila para frascos de vidro de 60,00 mL, correspondendo a $1/\beta = 0,5$ (34, 51). Os frascos foram fechados com um septo de PTFE e uma cápsula de alumínio. Em seguida, termostatizou-se a amostra num banho de água a 40 °C, durante 15 minutos. Posteriormente, inseriu-se a fibra de SPME no espaço de cabeça do frasco durante 45 minutos. Por fim, recolheu-se a fibra para o interior do suporte e injectou-se no GC-qMS. Realizaram-se três réplicas para cada amostra.

Para a construção da curva de calibração, usando o método de adição padrão, que permitiu quantificar o α -bisabolol nas diferentes amostras de camomila, pesaram-se 2,0 g de inflorescências de camomila e adicionaram-se 50 μ L de solução padrão de α -bisabolol com as seguintes concentrações: 1,518, 3,511 e 6,695 μ g/L.

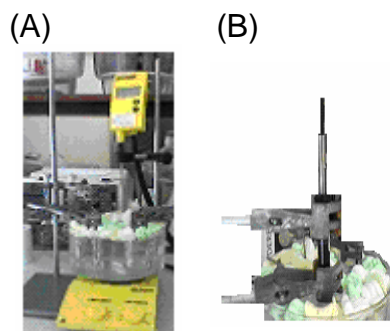


Figura 16 - Sistema de termostatização das amostras de camomila a 40 °C (A) e extracção dos compostos voláteis através da exposição da fibra ao espaço de cabeça (B).

3.6 GC–qMS

A fibra de SPME contendo os compostos voláteis sorvidos é introduzida no injector do cromatógrafo (250°C) onde permaneceu 5 minutos para permitir a desorção térmica dos compostos. O programa de temperatura do forno foi de 35°C durante 3 minutos, 65 °C a 2 °C/min, seguido de 65 a 90 °C a 1 °C/min, 90 °C (3min) para 150 °C a 2 °C/min e finalmente 150 a 220 °C 10 °C/min. O Hélio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 1,7mL/min e a pressão na cabeça da coluna foi de 12 psi. O espectrómetro de massa operou por impacto electrónico (EI) a 70 eV, fazendo um varrimento entre 30 – 300 m/z , a 3 ciclos/s, em modo fullscan. Os compostos voláteis foram identificados por comparação do seu espectro de massa e tempo de retenção com padrões puros, quando disponíveis, e com os espectros de massa da livreria Wiley275. Entre cada três análises, foi realizado um branco, que corresponde à análise da fibra sem contacto prévio com a amostra. A área cromatográfica foi usada como forma de estimar o teor relativo de cada componente da amostra.



Figura 17 - Desorção dos compostos voláteis no aparelho de GC–qMS.

3.7 Método DPPH[•]

Através do método do DPPH[•], determinou-se a actividade antioxidante e analisaram-se os comportamentos cinéticos de cinco padrões de sesquiterpenóides: aromadendreno, α -bisabolol, α -cedreno, *trans*-cariofileno (as populações estudadas apresentam β -cariofileno) e *trans*- β -farneseno. Para isso, adicionaram-se 25 μ L de cada padrão a 975 μ L de DPPH[•] e observaram-se as variações das absorvâncias do meio reaccional. Com a redução do radical a DPPH-H por parte do padrão, a absorvância vai diminuindo até atingir um valor constante, altura em que se considera que a reacção atingiu a estabilidade (47). Caso essa estabilidade não seja atingida, a reacção é seguida até aos 180 minutos (47). Quanto maior for a diminuição da absorvância, menor será a percentagem de DPPH[•] restante no meio e maior o poder antioxidante do padrão (47).

3.7.1 Análise do comportamento cinético

Para se saber a concentração da solução de DPPH[•] tem de ser feita uma curva de calibração (47). Esta curva é feita com diversas concentrações de soluções de DPPH[•] (96,37, 76,13, 61,68, 49,15, 38,55, 31,80 e 26,02 μ mol/L) preparadas em metanol (47). Fizeram-se as leituras das absorvâncias e traçou-se o gráfico A_{515} vs concentração de DPPH[•].

Os sesquiterpenóides estudados, foram inicialmente testados na sua forma pura, para analisar o comportamento cinético. Se para a sua forma pura se observasse uma inibição do DPPH[•] acima dos 50%, proceder-se-ia a diluições de modo a ser possível obter o perfil cinético do composto. Em cada análise do composto, leu-se a absorvância de um “branco”, constituído por 25 μ L de metanol e 975 μ L de solução de DPPH[•], que permite calcular a concentração real de DPPH[•] utilizada, por substituição na equação obtida para a curva de calibração. Em cada análise foram adicionados 25 μ L de composto/solução a testar, a 975 μ L de solução de DPPH[•], tendo sido feitas três réplicas e o respectivo branco. A diminuição da absorvância foi determinada a 515 nm ao minuto um e de quinze em quinze minutos até o valor da absorvância estabilizar

(altura em que a reacção atinge o equilíbrio), ou até serem atingidos os 180 minutos, sendo o branco considerado como o minuto zero da reacção. Para cada composto/solução testado, foi obtido um gráfico % DPPH[•] restante vs tempo representativo da reacção cinética ocorrida. A % DPPH[•] restante é calculada considerando a absorvância do branco igual a 100% de DPPH[•] restante.

3.7.2 Determinação do EC₅₀

Para os compostos com percentagem de inibição de DPPH[•] superior a 50 % foi feita uma análise para determinação do EC₅₀, ou seja, calcula-se a actividade antiradicalar, que é definida como a quantidade de antioxidante necessário para fazer diminuir a concentração inicial de DPPH[•] em 50% - parâmetro EC₅₀ (EC = “Efficient Concentration”) (47).

3.8 Tratamento de resultados

3.8.1 Metodologia de HS-SPME/GC–qMS

3.8.1.1 Reprodutibilidade

A cada composto identificado por HS-SPME/GC–qMS correspondeu uma área cromatográfica, obtida pela média das réplicas efectuadas para cada população de camomila. A reprodutibilidade das réplicas foi expressa pelo desvio padrão relativo (RSD).

A Análise em Componentes Principais (PCA) foi aplicada usando o software CATS, às áreas não normalizadas de 27 compostos identificados por GC–qMS (número total de 14 amostras, cada uma com 3 réplicas). Esta metodologia é usada como uma técnica exploratória, que permite estudar as principais fontes de variabilidade presentes no conjunto de dados utilizados, a qual permite detectar a formação de grupos e estabelecer relações entre as diferentes populações de camomila (objecto) e o tipo de compostos sesquiterpénicos identificados (variáveis).

3.8.1.2 Método de adição padrão

O método de adição padrão foi aplicado com o objectivo de estimar o teor em α -bisabolol emitido pelas inflorescências. Este, consiste na adição de quantidades crescentes do composto de interesse, neste caso, o α -bisabolol, a quantidades conhecidas de amostra, a fim de se construir uma curva de calibração. Para estimar a concentração do α -bisabolol nas diferentes amostras, identificou-se o ponto onde a recta intercepta o eixo das abcissas, ponto esse que corresponde à concentração do α -bisabolol na amostra sem adição do padrão. Este vai permitir, por substituição na equação da recta, a determinação da quantidade do composto pretendido.

O erro associado ao método, é dado através do desvio padrão residual,

$$S_{y/x}, \text{ calculado como, } S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + m \cdot x_i)]^2}{N - 2}}, \text{ expresso em percentagem, em}$$

que: y_i são os valores individuais das áreas cromatográficas, b é a ordenada na origem, m é o declive da recta, x_i são os valores das concentrações do padrão utilizado e N é o número de réplicas. Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração.

A linearidade do método foi avaliada através da análise do coeficiente de correlação das curvas efectuadas (áreas cromatográficas vs concentração de padrão adicionado) para cada amostra.

3.8.2 Método DPPH[•]

Para a construção da curva de calibração para o DPPH[•] fizeram-se as leituras das absorvâncias *versus* concentração de DPPH[•]. O erro do método foi avaliado pela análise do RSD, calculado como a razão do desvio padrão das 3 réplicas em relação ao valor médio, expresso em percentagem. A linearidade foi avaliada através da análise do coeficiente de correlação da curva de calibração efectuada (absorvâncias vs. concentração de DPPH[•]).

3.8.3 Determinação dos limites de detecção (LOD)

O limite de detecção foi determinado para o método de adição do padrão e para o método do DPPH*. O limite de detecção (LOD), corresponde à menor quantidade de analito que é significativamente diferente de um branco. Aplicando a definição, para determinar o LOD de cada padrão deve-se medir o sinal de n amostras repetidas, calcular o desvio-padrão (s) das n medidas, medir o sinal de n amostras em branco (sem analito) e respectivo valor médio (y_{branco}) e por último, multiplicar o desvio padrão pelo valor da distribuição de t de Student, correspondente a $n-1$ graus de liberdade e 98% de confiança (49), sendo a equação resultante:

$$\text{LOD} = y_{\text{branco}} + t * s$$

Como os valores da distribuição de t de student estão próximos de 3, uma definição bastante usada do limite de detecção é (49):

$$\text{LOD} = y_{\text{branco}} + 3 * s$$

3.8.4 Determinação dos limites de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação foi determinado para o método de adição do padrão e para o método do DPPH*. No que diz respeito ao limite de quantificação (LOQ), este corresponde à quantidade de analito necessária para que este seja quantificado e, normalmente, respeita a seguinte expressão:

$$\text{LOQ} = y_{\text{branco}} + 10 * s$$

Como neste trabalho de projecto, o valor de y_{branco} é zero, dado que num branco não está presente o padrão em estudo, as equações tomam a seguinte forma:

$$\text{LOD} = 3 * s$$

$$\text{LOQ} = 10 * s$$

Para o presente trabalho realizaram-se três réplicas concordantes do padrão α -bisabolol para cada concentração e determinou-se o valor do desvio-padrão dessas três medidas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da fracção sesquiterpénica de inflorescências de camomila por HS-SPME/GC–qMS

4.1.1 Perfil global em sesquiterpenóides

A figura 18 representa um cromatograma de uma amostra de inflorescências de camomila, obtido por HS-SPME/GC–qMs.

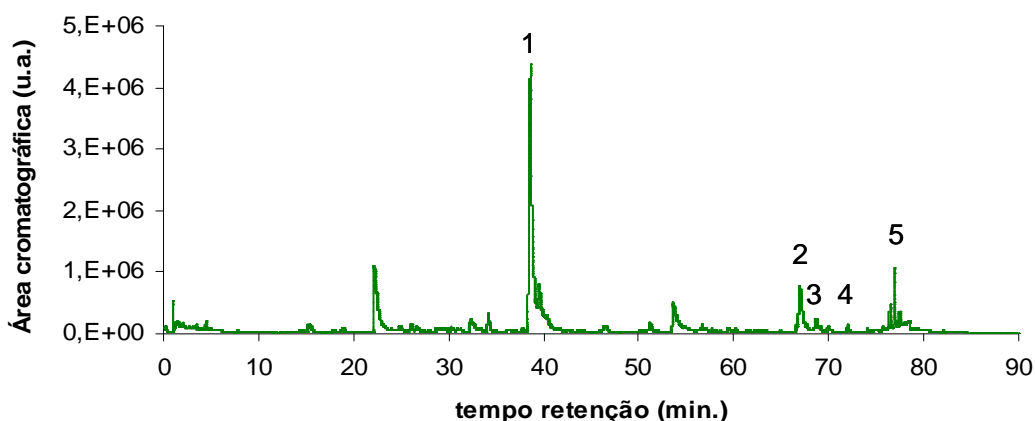


Figura 18 - Cromatograma obtido para as inflorescências de camomila C3: 1 – *trans*-β-farneseno, 2 – óxido de bisabolol B, 3 – óxido de bisabolona, 4 – α-bisabolol, 5 – óxido de bisabolol A. u.a. – unidades arbitrárias.

As tabelas 5 e 6 apresentam a composição sesquiterpénica de 15 populações de inflorescências de camomila, obtidas a partir de culturas biológica e convencional, de diferentes colheitas e zonas geográficas. A metodologia usada permitiu detectar várias famílias químicas, no entanto, no âmbito deste trabalho, apenas serão apresentados os resultados relativos aos compostos sesquiterpénicos. Foram detectados 27 compostos diferentes, correspondendo a estruturas do tipo hidrocarboneto [18], álcool [4], cetona [1] e respectivos óxidos [4].

Tabela 5 - Composição em sesquiterpenóides das populações de camomila de cultura biológica: área cromatográfica ($\times 10^{-6}$) em u.a. - unidades arbitrárias.

tr (min.)	Sesquiterpenóides	B1 (2005)		B2 (2005)		B3 (2005)		B4 (2005)		B5 (2007)		B6 (2007)		B7 (2007)	
		Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)
22,2	α -Cubebeno	—	—	25,9	(9)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25,3	Berieiaraduleno	—	—	16,5	(7)	—	—	—	—	0,2	(7)	—	—	—	—
27,5	β -Cubeneno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
29,6	β -Cariofileno	15,1	(9)	—	—	—	—	—	—	0,9	(1)	6,5	(4)	—	—
33,3	Aromadendreno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5,2	(3)	—	—
35,9	γ -Muuroleno	—	—	—	—	—	—	—	—	0,3	(6)	—	—	—	—
37,9	α -Amorfenos	—	—	—	—	—	—	—	—	1,1	(7)	—	—	—	—
38,9	<i>Trans</i> - β -Farneseno	2746,6	(7)	1251,5	(4)	1290,0	(7)	8,0	(4)	186,2	(12)	204,5	(5)	2067,2	(2)
39,6	Germacreno D	252,4	(8)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
39,8	β -Selineno	—	—	128,5	(1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
40,4	Biciclogermacreno	50,0	(11)	—	—	18,3	(3)	—	—	—	—	—	—	—	—
42,6	β -Bisaboleno	14,6	(13)	—	—	93,0	(9)	—	—	—	—	—	—	—	—
44,3	γ -Cadineno	7,8	(3)	11,4	(9)	43,0	(13)	—	—	—	—	—	—	—	—
45,0	α -Cedreno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45,8	<i>E,E</i> - α -Farneseno	62,6	(3)	38,5	(4)	76,4	(4)	—	—	—	—	—	—	—	—
46,9	Ar-Curcumeno	—	—	—	—	—	—	253,1	(12)	—	—	—	—	—	—
58,1	Óxido de cariofileno	—	—	—	—	—	—	5,7	(14)	—	—	—	—	—	—
63,2	β -Eleneno	—	—	22,4	(9)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
64,6	Valeranona	—	—	—	—	—	—	12,3	(18)	—	—	—	—	—	—
66,9	Espatuleno	54,4	(4)	82,2	(10)	—	—	—	—	169,2	(4)	871,5	(3)	15,3	(8)
67,0	Óxido de bisabolol B	116,1	(9)	521,7	(2)	303,0	(4)	—	—	26,0	(11)	410,8	(5)	381,3	(6)
68,6	Óxido de bisabolona	84,2	(12)	119,1	(9)	70,6	(7)	—	—	—	—	—	—	—	—
69,0	τ -Cadinol	—	—	32,4	(4)	15,1	(11)	—	—	—	—	—	—	—	—
71,1	β -Eudesmol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
72,0	α -Bisabolol	22,0	(8)	45,8	(4)	64,3	(3)	—	—	43,6	(4)	167,9	(3)	44,1	(7)
76,7	Camazuleno	45,0	(4)	14,1	(13)	19,1	(14)	—	—	—	—	—	—	—	—
76,9	Óxido de bisabolol A	140,6	(9)	164,8	(4)	135,3	(11)	—	—	244,4	(10)	231,4	(14)	107,3	(7)
	TOTAL	3611,3	(6)	2474,9	(3)	2010,0	(6)	279,3	(12)	671,9	(1)	1898,0	(4)	2615,2	(1)

Tabela 6 - Composição em sesquiterpenóides das populações de camomila de cultura convencional: área cromatográfica ($\times 10^{-6}$) em u.a. - unidades arbitrárias.

tr (min.)	Sesquiterpenóides	C1 (2005)		C2 (2005)		C3 (2005)		C4 (2005)		C5 (2005)		C6 (2007)		C7 (2007)		C8 (2007)	
		Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)
22,2	α -Cubebeno	—	—	—	—	7,4	(13)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25,3	Berieiaraduleno	—	—	9,9	(8)	6,5	(13)	5,8	(15)	—	—	—	—	—	—	—	—
27,5	β -Cubeneno	—	—	6,7	(16)	4,0	(10)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
29,6	β -Cariofileno	10,0	(11)	16,2	(7)	—	—	—	—	—	—	9,8	(1)	17,7	(6)	15,9	(9)
33,3	Aromadendreno	—	—	15,8	(14)	16,6	(15)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
35,9	γ -Muuroleno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
37,9	α -Amorfenos	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7,6	(3)	15,6	(8)	8,2	(6)
38,9	<i>Trans</i> - β -Farneseno	2166,1	(9)	1595,9	(4)	3970,1	(2)	2578,9	(11)	1143,1	(7)	6240,2	(4)	6100,0	(7)	4533,3	(1)
39,6	Germacreno D	145,1	(6)	162,3	(11)	131,4	(7)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
39,8	β -Selineno	—	—	—	—	101,0	(10)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
40,4	Biciclogermacreno	31,6	(2)	54,8	(12)	24,2	(10)	42,5	(14)	10,0	(11)	—	—	—	—	—	—
42,6	β -Bisaboleno	14,8	(6)	19,0	(11)	30,3	(13)	13,2	(5)	—	—	—	—	—	—	—	—
44,3	γ -Cadineno	7,0	(10)	11,1	(12)	19,5	(16)	9,9	(10)	17,5	(9)	—	—	—	—	—	—
45,0	α -Cedreno	—	—	—	—	—	—	8,0	(9)	—	—	—	—	—	—	—	—
45,8	<i>E,E</i> - α -Farneseno	199,3	(12)	79,2	(1)	117,1	(1)	118,6	(11)	—	—	—	—	—	—	—	—
46,9	Ar-Curcumeno	—	—	—	—	42,7	(11)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
58,1	Óxido de cariofileno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
63,2	β -Eleneno	—	—	—	—	21,6	(5)	13,7	(11)	—	—	—	—	—	—	—	—
64,6	Valeranona	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
66,9	Espatuleno	—	—	49,1	(4)	—	—	—	—	42,6	(12)	—	—	—	—	20,0	(7)
67,0	Óxido de bisabolol B	415,0	(11)	270,9	(5)	916,8	(8)	716,4	(9)	154,1	(5)	388,6	(3)	211,3	(4)	264,0	(2)
68,6	Óxido de bisabolona	50,1	(8)	60,8	(16)	189,2	(7)	83,4	(10)	176,7	(7)	—	—	—	—	—	—
69,0	τ -Cadinol	13,4	(9)	17,1	(2)	43,3	(4)	30,3	(14)	23,4	(15)	—	—	—	—	—	—
71,1	β -Eudesmol	8,2	(2)	10,6	(10)	13,1	(9)	24,5	(11)	—	—	—	—	—	—	—	—
72,0	α -Bisabolol	88,4	(5)	25,8	(14)	135,4	(11)	97,8	(16)	17,3	(14)	45,5	(7)	24,4	(7)	60,4	(4)
76,7	Camazuleno	22,2	(10)	9,6	(3)	18,0	(6)	37,1	(4)	—	—	—	—	—	—	—	—
76,9	Óxido de bisabolol A	145,9	(11)	74,9	(14)	264,7	(16)	253,3	(9)	352,3	(2)	76,5	(10)	55,3	(4)	95,2	(7)
	TOTAL	3317,1	(8)	2489,6	(3)	6075,7	(4)	4033,4	(8)	1937,0	(5)	6768,2	(4)	6424,4	(7)	4997,1	(1)

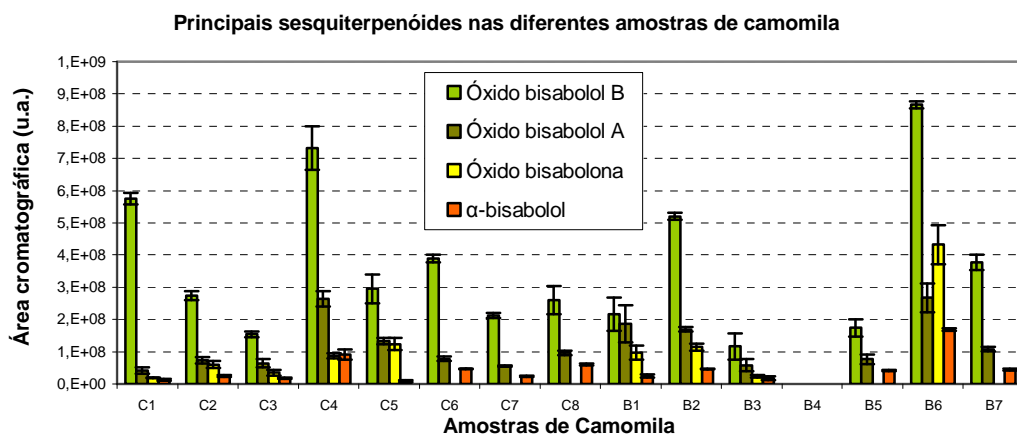


Figura 19 - Principais sesquiterpenóides nas diferentes populações de camomila estudadas.

Pela análise das tabelas acima referidas, verifica-se que em 12 das 15 populações analisadas, o composto maioritário é o *trans*- β -farneseno, com exceção das amostras B4, B5 e B6, cujos compostos maioritários são o ar-curcumeno, o óxido de bisabolol A e o espatulenol, respectivamente. Com exceção da amostra B4, as populações de camomila apresentam em comum compostos como o *trans*- β -farneseno, o α -bisabolol e os óxidos de bisabolol A e B, cujos efeitos biológicos são muito importantes e conhecidos (15).

Os sesquiterpenóides são metabolitos secundários, cuja biogénese se encontra condicionada por vários factores como o tipo de cultura, o clima, a fauna e flora vizinhas e o tipo de solo (2). Como se constata pela análise das tabelas 5 e 6, o número total em sesquiterpenóides para as populações analisadas varia entre 4 e 20, sendo que, para a cultura biológica, o número em sesquiterpenóides varia entre 4 e 14 e para a cultura convencional varia entre 6 e 20. Quanto à composição sesquiterpénica das inflorescências de camomila, verifica-se que as populações organizadas de modo decrescente em termos de teor em sesquiterpenóides totais, dão a seguinte sequência: C6, C7, C3, C8, C4, B1, C1, B7, C2, B2, B3, B6, C5, B5 e B4. Deste modo, constata-se que os dados das tabelas 5 e 6, nos permitem fazer uma distinção entre os tipos de cultura: o tipo de cultura convencional permite obter maior teor em sesquiterpenóides do que o tipo de cultura biológica.

O β -selineno tem sido relacionado com culturas geneticamente modificadas (17). Como no Brasil não se usam sementes geneticamente modificadas mas este composto aparece em B2 e C3, indica a ocorrência *in vivo* de um processo biossintético activo para este composto em populações não geneticamente modificadas. Também na bibliografia tem sido referido que o β -eudesmol é característico de populações selvagens (17), o que não se verifica aqui. Nas 15 populações de camomila estudadas, apenas as populações de cultura convencional [C1, C2, C3 e C4] apresentam este sesquiterpenol. Para além destas populações serem todas de cultura convencional, elas também provêm da região norte do Estado do Paraná. Isto pode sugerir a ocorrência *in vivo* de um processo biossintético activo para este composto.

Tendo em conta a composição em bisabolóides, pode-se definir o quimiotipo das populações analisadas (52). Pelas tabelas acima referidas e pela interpretação da figura 19, verifica-se que todas as populações de camomila pertencem ao quimiotipo do óxido de bisabolol B, com excepção da amostra B1 que apresenta áreas similares para ambos os óxidos. A amostra B4 foi considerada uma amostra atípica pois não apresenta bisabolóides, o *trans*- β -farneseno não é o composto maioritário e o teor em sesquiterpenóides totais é 2,4 a 24x inferior às outras populações.

Por HS-SPME/GC-qMS foi, também possível avaliar o efeito de tempo de armazenamento das populações de camomila, através do estudo das amostras colhidas no mesmo ano mas analisadas em momentos diferentes. A tabela 7 apresenta a composição sesquiterpénica de 5 populações de inflorescências de camomila, obtidas em dois momentos de análise diferentes (logo após colheita e dois anos depois da colheita). A figura 20 mostra a representação gráfica das áreas cromatográficas da composição em sesquiterpenóides totais para as populações de camomila analisadas para estas diferentes alturas de colheita.

Tabela 7 - Efeito do tempo de armazenamento no teor em sesquiterpenóides: área cromatográfica ($\times 10^{-6}$) em u.a. - unidades arbitrárias.

tr (min.)	Sesquiterpenóides	B1		B1+2		B3		B3+2		C1		C1+2		C3		C3+2		C5		C5+2	
		Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)
22,2	α -Cubebeno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7,4	(13)	—	—	—	—	—	—
25,3	Berieiaraduleno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8,0	(4)	6,5	(13)	19,3	(5)	—	—	7,8	(6)
27,5	β -Cubeneno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4,0	(10)	—	—	—	—	—	—
29,6	β -Cariofileno	15,1	(9)	24,6	(4)	—	—	—	—	10,0	(11)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
33,3	Aromadendreno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16,6	(15)	—	—	—	—	—	—
35,9	γ -Muuroleno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
37,9	α -Amorfeno	—	—	24,4	(4)	—	—	3,0	(7)	—	—	5,2	(12)	—	—	8,2	(2)	—	—	7,6	(6)
38,9	<i>Trans</i> - β -Farneseno	2746,6	(7)	3589,0	(8)	1290,0	(7)	670,6	(3)	2166,1	(9)	990,5	(8)	3970,1	(2)	958,7	(3)	1143,1	(7)	1054,1	(8)
39,6	Germacreno D	252,4	(8)	—	—	—	—	—	—	145,1	(6)	—	—	131,4	(7)	—	—	—	—	—	—
39,8	β -Selineno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	101,0	(10)	—	—	—	—	—	—
40,4	Biciclogermacreno	50,0	(11)	—	—	18,3	(3)	—	—	31,6	(2)	—	—	24,2	(10)	—	—	10,0	(11)	—	—
42,6	β -Bisaboleno	14,6	(13)	1,5	(11)	93,0	(9)	—	—	14,8	(6)	—	—	30,3	(13)	—	—	—	—	—	—
44,3	γ -Cadineno	7,8	(3)	23,2	(6)	43,0	(13)	—	—	7,0	(10)	5,3	(8)	19,5	(16)	7,3	(2)	17,5	(9)	17,3	(11)
45,0	α -Cedreno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45,8	<i>E,E</i> - α -Farneseno	62,6	(3)	35,4	(4)	76,4	(4)	—	—	199,3	(12)	21,0	(11)	117,1	(1)	—	—	—	—	—	—
46,9	Ar-Curcumeno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	42,7	(11)	—	—	—	—	—	—
58,1	Óxido de cariofileno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
63,2	β -Eleneno	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	21,6	(5)	—	—	—	—	—	—
64,6	Valeranona	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
66,9	Espatulenol	54,4	(4)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	42,6	(12)	—	—
67,0	Óxido de bisabolol B	116,1	(9)	162,5	(20)	303,0	(4)	116,7	(5)	415,0	(11)	131,5	(12)	916,8	(8)	154,1	(6)	154,1	(5)	113,6	(11)
68,6	Óxido de bisabolona	84,2	(12)	96,7	(23)	70,6	(7)	23,1	(12)	50,1	(8)	13,4	(8)	189,2	(7)	30,4	(3)	176,7	(7)	114,0	(8)
69,0	τ -Cadinol	—	—	—	—	15,1	(11)	—	—	13,4	(9)	—	—	43,3	(4)	—	—	23,4	(15)	—	—
71,1	β -Eudesmol	—	—	—	—	—	—	—	—	8,2	(2)	—	—	13,1	(9)	—	—	—	—	—	—
72,0	α -Bisabolol	22,0	(8)	23,1	(10)	64,3	(3)	14,8	(18)	88,4	(5)	20,1	(12)	135,4	(11)	19,3	(6)	17,3	(14)	8,3	(6)
76,7	Camazuleno	45,0	(4)	—	—	19,1	(14)	—	—	22,2	(10)	—	—	18,0	(6)	—	—	—	—	—	—
76,9	Óxido de bisabolol A	140,6	(9)	156,6	(19)	135,3	(11)	45,2	(14)	145,9	(11)	37,6	(12)	264,7	(16)	70,6	(2)	352,3	(2)	218,0	(5)
	TOTAL	3611,3	(6)	4149,4	(11)	2010,0	(6)	874,0	(10)	3317,1	(8)	1232,2	(10)	6075,7	(4)	1267,1	(4)	1937,0	(5)	1539,4	(8)

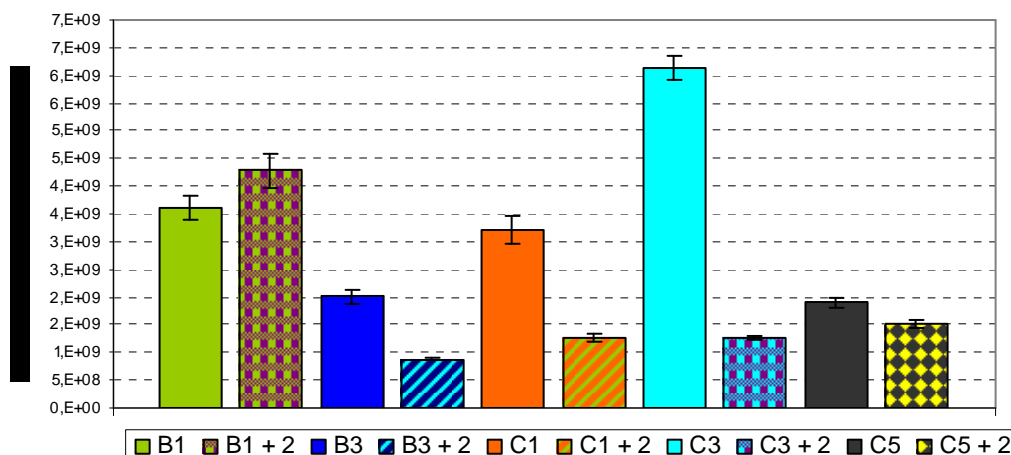


Figura 20 - Áreas cromatográficas dos sesquiterpenóides totais, para as populações de camomila analisadas no ano da colheita e dois anos após colheita (código da amostra + 2). u.a. - unidades arbitrárias.

Pela análise da tabela 7 e da figura 20, verifica-se que há um maior teor em sesquiterpenóides nas populações de camomila analisadas no ano da colheita. As amostras que foram analisadas após dois anos de terem sido colhidas (dois anos corresponde ao tempo máximo de prateleira para as populações de camomila), apresentam uma diminuição significativa no seu teor em sesquiterpenóides, com excepção da população B1. A percentagem de perda em termos de sesquiterpenóides totais varia entre 20,5% e 79,1% (para B3 foi de 56,5%, C1 foi de 62,9%, C3 foi de 79,1% e C5 foi de 20,5%), devendo-se, essencialmente, à diminuição do *trans*- β -farneseno, do α -bisabolol, dos óxidos de bisabolol A e B e óxido de bisabolona, desaparecendo muitos dos sesquiterpenóides que existiam nas populações analisadas após colheita, como é o caso do camazuleno. Isto deve-se ao facto de, durante a secagem, as plantas ficam desidratadas devido há perda natural de água, sofrendo também uma maior redução em termos da sua composição em compostos voláteis (18), dependendo esta redução de factores como a temperatura ambiente, as condições de armazenamento (a secagem das plantas ao sol pode levar a um processo de foto-decomposição, degradando os componentes químicos e levando a alterações de odor, cor e sabor) e do conteúdo e tipo de compostos químicos presentes nas plantas (18).

4.1.2 Estimativa do potencial biológico com base no teor total de sesquiterpenóides

A análise em componentes principais, PCA, foi aplicada às áreas não normalizadas das 14 populações, para estabelecer relações entre os compostos e as várias populações de camomila. A população B4 foi considerada atípica, pelo que não foi considerada no PCA.

A figura 21 mostra as coordenadas factoriais PC1xPC2, os quais contêm 97,4% da variabilidade.

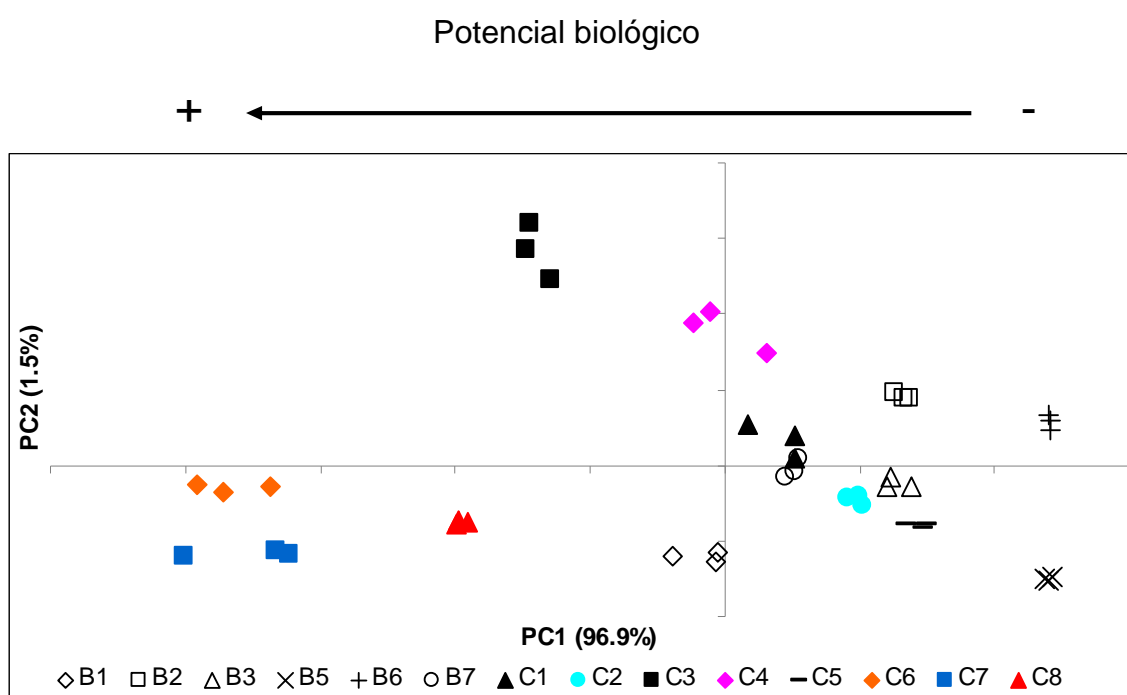


Figura 21 - Coordenadas factoriais da análise por componentes principais das áreas não normalizadas das populações de camomila estudadas.

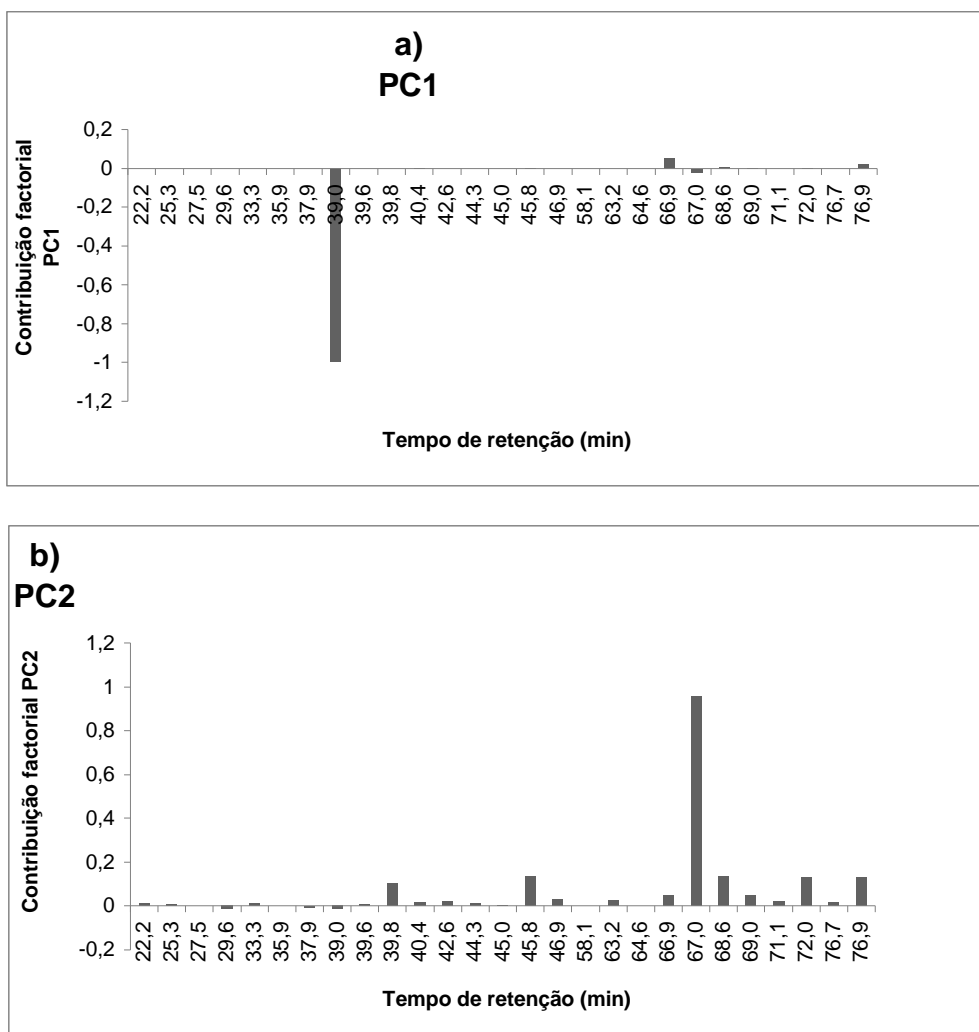


Figura 22 - Contribuição factorial da análise por componentes principais das áreas não normalizadas das populações de camomila estudadas: a) PC1, b) PC2.

As amostras estão dispersas ao longo do PC1 (96,9% da variabilidade) de acordo com *trans*- β -farneseno, que varia entre 187,2 – 6240,2 ($\times 10^{-6}$), sendo o composto maioritário para todas as amostras, com excepção das amostras B5 e B6 e, de acordo com o teor total em sesquiterpenóides. Quanto ao PC2, que explica 1,5% da variabilidade, verifica-se que este se encontra de acordo com o teor em óxido de bisabolol B (t_r = 67,0 minutos), como se pode verificar através da contribuição factorial deste composto. Assim, verifica-se que no PC1 negativo, se encontram as amostras C6, C7, C8 e C3, as quais apresentam teores mais elevados em sesquiterpenóides, o que permite inferir maior efeito biológico, tendo em conta os efeitos benéficos para a saúde já mencionados para estes compostos (15).

4.2 Desenvolvimento de uma metodologia para quantificação do α -bisabolol

4.2.1 Análise directa das inflorescências – método de adição padrão

Considerando que o α -bisabolol é um dos compostos com elevado potencial biológico na camomila, foi desenvolvida uma metodologia que permitisse estimar o teor neste composto, nas inflorescências de camomila.

Atendendo a que as inflorescências de camomila são uma matriz muito heterogénea, optou-se por adicionar o padrão num vidro colocado no meio das inflorescências. A aplicação directamente nas inflorescências conduziria a uma retenção variável em função do carácter heterogéneo da matriz, o que provocaria uma elevada variabilidade nos resultados.

As inflorescências de camomila foram analisadas pela metodologia de HS-SPME/GC-qMS previamente desenvolvida. Neste caso foi aplicado o método de adição padrão com o objectivo de quantificar o teor em α -bisabolol emitido pelas inflorescências.

O método de adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas do(s) composto(s) de interesse, neste caso, α -bisabolol, a quantidades conhecidas de amostra, a fim de se conseguir construir uma curva de calibração. O ponto onde a curva corta o eixo das abcissas, corresponde ao pico do composto de interesse na amostra sem adição do padrão, e permite determinar a concentração desse composto. A exactidão dos resultados repousa na fiabilidade da curva elaborada, sendo a preparação e a diluição das soluções padrão, bem como das amostras, as principais causas de erro.

A figura 23 mostra um exemplo de uma curva de calibração (área cromatográfica vs concentração do padrão adicionado) obtida para as inflorescências de camomila C3 (ver áreas cromatográficas no anexo I).

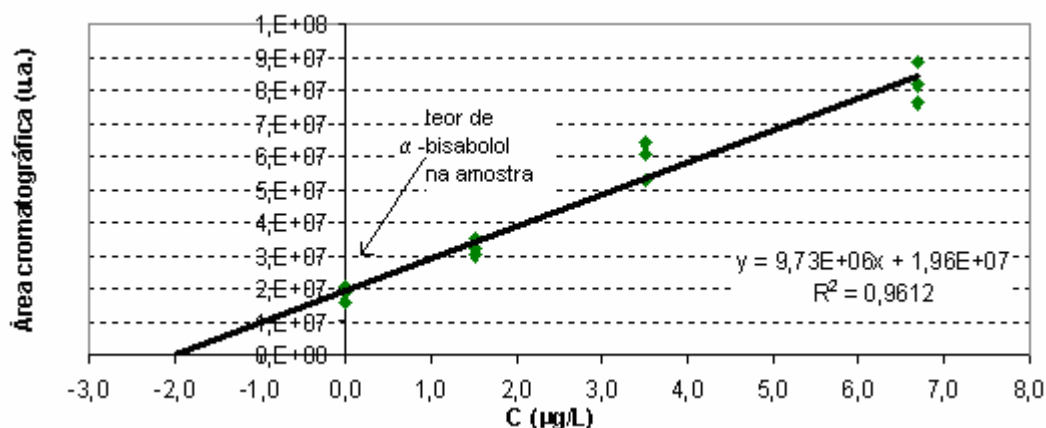


Figura 23 - Curva de calibração do α -bisabolol (área cromatográfica vs concentração do padrão adicionado), u.a. - unidades arbitrárias.

Pelo conceito do método de adição do padrão e pela equação da recta obtida, por substituição do valor de y por zero, consegue-se determinar a concentração do α -bisabolol nas inflorescências de camomila, que corresponde ao valor onde a recta intersecta o eixo das abcissas.

A tabela 8 mostra as equações das curvas de calibração, área cromatográfica vs concentração ($\mu\text{g/L}$) do padrão adicionado e área cromatográfica vs massa (ng) de padrão adicionado e o teor de α -bisabolol, expresso em ng de α -bisabolol/g de camomila, determinado por HS-SPME/GC-qMS e pelo método de adição do padrão, para todas as populações de camomila estudadas (ver áreas cromatográficas no anexo I).

Tabela 8 - Teor de α -bisabolol determinado por HS-SPME/GC-qMS e pelo método de adição do padrão.

Amostras	curva de calibração	R^2	curva de calibração	R^2	α -bisabolol		S y/x (%)
	área cromatográfica vs $\mu\text{g/L}$ de padrão adicionado		área cromatográfica vs ng de padrão adicionado		($\mu\text{g/L}$)	(ng/g) *	
Orgânica (B1)	$y=3,15\text{E}+07x + 2,05\text{E}+07$	0,9688	$y=6,29\text{E}+08x + 9,05\text{E}+06$	0,9690	0,651	0,017	21
PR (B5)	$y=1,91\text{E}+07x + 3,93\text{E}+07$	0,9849	$y=3,81\text{E}+08x + 3,93\text{E}+07$	0,9858	2,06	0,052	13
ANG (B7)	$y=1,12\text{E}+07x + 4,25\text{E}+07$	0,9713	$y=2,23\text{E}+08x + 4,25\text{E}+07$	0,9697	3,79	0,095	10
RE (C3)	$y=9,73\text{E}+06x + 1,96\text{E}+07$	0,9612	$y=1,94\text{E}+08x + 1,96\text{E}+07$	0,9614	2,01	0,051	12
Pró-vida (C5)	$y=1,04\text{E}+07x + 9,21\text{E}+06$	0,9666	$y=2,08\text{E}+08x + 9,21\text{E}+06$	0,9664	0,886	0,022	12
Tv (C6)	$y=1,23\text{E}+07x + 4,54\text{E}+07$	0,9929	$y=2,45\text{E}+08x + 4,54\text{E}+07$	0,9925	3,69	0,093	6
R (C7)	$y=6,18\text{E}+06x + 2,28\text{E}+07$	0,9712	$y=1,23\text{E}+08x + 2,28\text{E}+07$	0,9701	3,69	0,093	7
CC (C8)	$y=1,98\text{E}+07x + 5,23\text{E}+07$	0,9540	$y=3,94\text{E}+08x + 5,25\text{E}+07$	0,9526	2,64	0,066	23

* - ng de α -bisabolol/g de camomila; S y/x - desvio padrão residual (erro associado ao método)

A tabela 9 mostra a gama de linearidade, o coeficiente de correlação (R^2), a reprodutibilidade (RSD) e respectivos LOD e LOQ obtidos para o método de adição do padrão.

Tabela 9 - Limites de detecção e quantificação do α -bisabolol para o método de adição padrão.

Gama de massa do padrão (ng)	$y = mx + b$ ^(*)	R^2	média (ng)	σ (ng)	RSD (%)	LOD (ng) **	LOQ (ng) **
0 – 0,335	$y=2,23\text{E}8x + 4,25\text{E}7$	0,9697	0,0820	0,0065	(8)	0,0196	0,0653

^(*) y - área cromatografia em unidades arbitrárias (u.a.); x - massa do padrão α -bisabolol em ng;

σ - desvio padrão; LOD - Limite de detecção; LOQ - Limite de quantificação; u.a.- unidades arbitrárias;

** ng - ng de α -bisabolol

A curva obtida pelo método de adição padrão apresenta uma gama de linearidade para as massas de padrão utilizadas (0 - 0,335 ng), com um coeficiente de correlação de 0,9697. A reprodutibilidade do método é dada em termos de desvio padrão relativo (RSD), expresso em percentagem, cujo valor é de 8% e apresenta como limites de detecção (LOD = 0,0196 ng) e de quantificação (LOQ = 0,0653 ng).

De acordo com os dados da tabela 8 verifica-se que a estimativa do teor em α -bisabolol para as inflorescências das populações de camomila varia entre 17 e 95 pg de α -bisabolol/g de camomila, sendo as populações B7, C6, C7 e C8 as que apresentam maior teor em α -bisabolol e as populações C5 e B1 as que apresentam menor teor em α -bisabolol. Pela tabela 8, verifica-se que o referido composto pode ser organizado por ordem decrescente do seguinte modo: B7, C6, C7, C8, B5, C3, C5 e B1. As populações C5 e B1 são aquelas que apresentam menor teor em α -bisabolol. Pelo método de adição do padrão não foi possível fazer uma distinção entre os tipos de cultura e as zonas geográficas.

As metodologias de HS-SPME/GC-qMS e método de adição padrão, permitiram avaliar o potencial biológico da planta com base na caracterização da fracção sesquiterpénica e estimativa do teor de α -bisabolol nas diferentes populações de camomila. Assim, a futura valorização da *Matricaria recutita* L., pode ser estendida a outros sesquiterpenóides que ainda não foram estudados nesta matriz, mas que são conhecidos noutros produtos naturais, como frutos e plantas. Por exemplo, a avaliação *in vitro* do efeito anti-microbiano, do óleo essencial das espécies endémicas *Psiadia*, revelou que o óleo essencial inibiu o crescimento de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aureofaciens*, *Aspergillus ochraceus*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis* e *Fusarium moniliforme*. Esta actividade foi atribuída à presença de sesquiterpenóides como o α -farneseno, β -farneseno e β -bisaboleno (19). Os óleos essenciais das flores de *Erigeron floribundus*, que contêm β -farneseno, β -cariofileno e germacreno D, mostraram actividade anti-fungica (20). Por outro lado, a actividade antioxidante dos óleos essenciais de *Teucrium orientale* L., parece estar relacionada com a quantidade de β -cariofileno. Verifica-se maior actividade antioxidante quando a quantidade de β -cariofileno é maior (21).

4.3 Metodologias para obtenção de extractos enriquecidos em sesquiterpenóides - Avaliação exploratória dos seus potenciais

A fim de se conseguir caracterizar a composição em sesquiterpenóides das populações de camomila, surgiu a necessidade de recorrer a processos que permitissem aumentar a extractabilidade desses compostos, de forma a obter extractos enriquecidos. Assim, pretendeu-se explorar os métodos de alta pressão isostática e de extracção com CO₂ supercrítico, de forma a avaliar os seus potenciais como métodos de preparação de amostras, que permitissem obter extractos enriquecidos em sesquiterpenóides.

4.3.1 Alta pressão isostática

A tabela 10 apresenta a composição sesquiterpénica das inflorescências da população de camomila C6, com e sem tratamento por alta pressão isostática, analisadas pela metodologia de HS-SPME/GC-qMS previamente desenvolvida.

Tabela 10 - Áreas cromatográficas dos sesquiterpenóides obtidos antes e após as inflorescências serem submetidas a tratamento por alta pressão isostática, área cromatográfica ($\times 10^{-6}$) em u.a.

tr (min.)	Sesquiterpenóides	C6			
		Inflorescências		Inflorescências após AP*	Inflorescências hidratadas e AP*
		média (u.a.) (n=3)	RSD (%)	área (u.a.) (n=1)	área (u.a.) (n=1)
22,2	α -Cubebeno	—	—	—	4,3
25,3	Berqueiaraduleno	—	—	—	6,8
29,6	β -Cariofileno	9,8	(1)	—	5,4
30,7	β -Elemeno	—	—	—	4,2
37,9	α -amorfenos	7,6	(3)	4,0	—
39,0	<i>trans</i> - β -Farneseno	6240,2	(4)	2624,2	2903,6
66,6	Óxido de bisabolol	—	—	—	62,0
66,9	Espatuleno	—	—	20,1	6,2
67,0	Óxido de bisabolol B	388,6	(3)	239,3	189,0
72,0	α -Bisabolol	45,5	(7)	57,3	53,6
76,9	Óxido de bisabolol A	76,5	(10)	137,3	176,9
	Total	6768,3	(5)	3082,3	3412,2

Nota: pressão utilizada - 400 MPa tempo - 10 minutos
u.a. - unidades arbitrárias; * AP - alta pressão

Pela análise da tabela 10, verifica-se que, após as inflorescências da população de camomila C6 terem sido sujeitas a alta pressão isostática, há uma diminuição no teor total de sesquiterpenóides, quer para a amostra não hidratada, quer para a amostra hidratada, respectivamente. Também é possível verificar que, com o tratamento de alta pressão surgem compostos novos, que não apareciam quando as amostras eram analisadas apenas por HS-SPME, como o α -cubebeno, o berqueiaraduleno, o β -cariofileno, o β -elemeno, o óxido de bisabolol e o espatulenol, principalmente quando a amostra é hidratada.

Pela bibliografia, sabe-se que amostras secas quando submetidas a alta pressão, praticamente não sofrem alterações ao nível estrutural, pois apresentam uma estrutura muito rígida e compacta (39). No entanto, quando a amostra hidratada é pressurizada, verifica-se que há um aumento no número de sesquiterpenóides identificados (passando de 6 compostos identificados para 10), o que sugere que a hidratação da planta permite aumentar a extractabilidade destes compostos. Isto pode ser explicado pelo facto da hidratação das inflorescências levar a que as células das mesmas fiquem túrgidas, perdendo a rigidez inicial. Assim, quando estas são sujeitas a alta pressão vão ocorrer possíveis alterações estruturais e rompimento das células e dos organelos onde se encontram os sesquiterpenóides, levando ao aumento da sua extractabilidade (40), permitindo assim, que estes se tornem mais acessíveis para passarem à fase de vapor e à fibra de SPME.

4.3.2 Extracção com CO₂ supercrítico

A extracção com CO₂ supercrítico é um método bastante promissor no que se refere à obtenção de óleos essenciais de variados produtos, como populações de camomila (41) e outras plantas, de amendoins, entre outros. Assim, recorreu-se à extracção com CO₂ supercrítico de forma a avaliar o seu potencial como método de preparação de amostras, que permitissem obter extractos enriquecidos em sesquiterpenóides.

Tabela 11 - Áreas cromatográficas dos sesquiterpenóides obtidos antes e após as inflorescências serem submetidas a extracção com CO₂ supercrítico, obtidas por HS-SPME/GC–qMS, área cromatográfica (x10⁻⁶) em u.a.

tr (min.)	Sesquiterpenóides	C7					
		Inflorescência		Inflorescências após SP	Extracto etanólico (1,5h)	Extracto etanólico (3,5h)	Extracto etanólico (5h)
		média (u.a.) (n=3)	RSD (%)	área (u.a.) (n=1)	área (u.a.) (n=1)	área (u.a.) (n=1)	área (u.a.) (n=1)
29,6	β-Carifileno	17,7	(6)	—	—	—	—
37,9	α-amorfenos	15,6	(8)	—	—	—	—
39,0	<i>trans</i> - β-Farneseno	6100,0	(7)	410,6	826,5	205,3	1031,8
67,0	Óxido de bisabolol B	211,3	(4)	—	155,6	67,0	222,5
72,0	α-Bisabolol	24,4	(7)	—	35,1	13,0	48,1
76,9	Óxido de bisabolol A	55,3	(4)	1,1	18,0	54,7	72,7
	Total	6424,3	(6)	411,6	1035,1	340,0	1375,1

u.a. - unidades arbitrárias; SP - extracção com CO₂ supercrítico

Como se pode verificar pela análise da tabela 11, após a amostra ser sujeita a extracção com CO₂ supercrítico e analisada por HS-SPME/GC–qMS, verifica-se que há uma diminuição drástica do número de sesquiterpenóides identificados nas inflorescências das populações de camomila, o que nos indica que estes compostos passaram para o extracto obtido no supercrítico.

Analisando os resultados obtidos para os extractos obtidos após 1,5h e com mais 3,5h de extracção (tempo total de extracção de 5h), verificamos que a maior parte dos sesquiterpenóides presentes no extracto (cerca de 75,3%), são extraídos logo na primeira hora e meia de extracção.

A extracção com CO₂ supercrítico mostra-se uma técnica promissora no que diz respeito à obtenção de extractos enriquecidos em bisabolóides, nomeadamente, em α-bisabolol e seus óxidos.

4.4 Avaliação do potencial antioxidante dos sesquiterpenóides da camomila

Foi avaliada a actividade antioxidante de 5 compostos terpénicos (padrões) detectados na composição das inflorescências das populações de camomila: aromadendreno, α-bisabolol, α-cedreno, *trans*-cariofileno (as populações de camomila apresentam na sua composição sesquiterpénica o β-

cariofileno) e *trans*- β -farneseno. Este estudo foi realizado por recurso ao método do DPPH $^{\bullet}$. Inicialmente, foi preparada a curva de calibração para o DPPH $^{\bullet}$ (tabela 12 e figura 24).

Tabela 12 - Absorvância medida para as diferentes concentrações de DPPH $^{\bullet}$ e respectivo desvio padrão.

Concentração DPPH $^{\bullet}$ (μ M)	Abs _{515 nm}	
	média (n=3)	RSD (%)
26,02	0,272	1,39
31,80	0,357	0,16
39,55	0,466	0,33
49,15	0,590	0,26
61,68	0,736	0,16
76,13	0,898	0,23
96,37	1,133	0,44

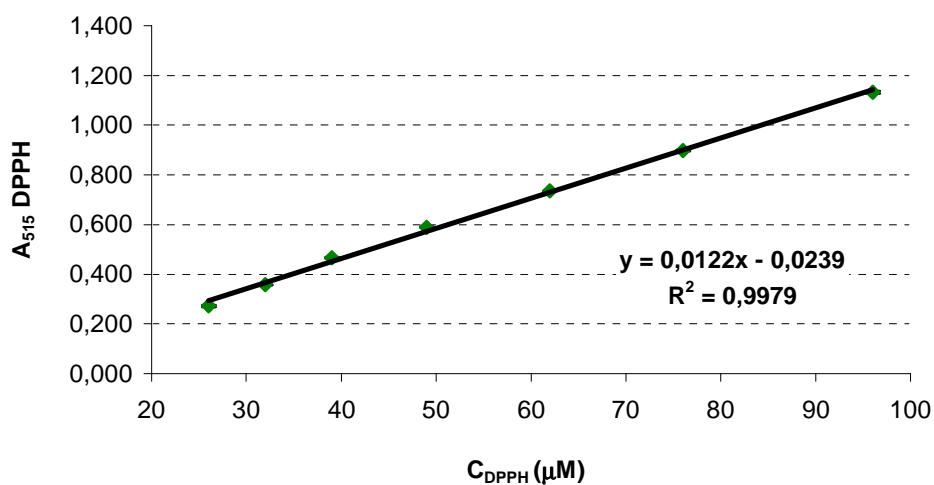


Figura 24 - Curva de calibração do DPPH $^{\bullet}$.

A tabela 13 mostra a gama de linearidade, o coeficiente de correlação (R^2), a reprodutibilidade (RSD) e respectivos LOD e LOQ obtidos para a curva de calibração do DPPH $^{\bullet}$.

Tabela 13 - Limites de detecção e quantificação para a curva de calibração obtida para o DPPH[•].

Gama de concentrações (μM)	$y = mx+b$ ⁽¹⁾	r^2	Média DPPH [•] (μM)	σ (μM)	RSD (%)	LOD (μM)	LOQ (μM)
26,0 – 96,0	$y = 0,0122x - 0,0239$	0,9979	24,1	0,310	(1)	0,930	3,10

⁽¹⁾ y - absorvâncias a 515 nm; x - concentração de DPPH[•] em μM; σ - desvio padrão

Analisando a tabela 13 verifica-se que a curva de calibração apresenta linearidade na gama de concentrações de DPPH[•], havendo proporcionalidade entre a concentração e a absorvância.

A figura 25 mostra o comportamento cinético do *trans*-β-farneseno, com base na diminuição da quantidade de DPPH[•] que não reagiu. Este foi analisado puro e para uma gama de concentrações de 150 a 10 mM.

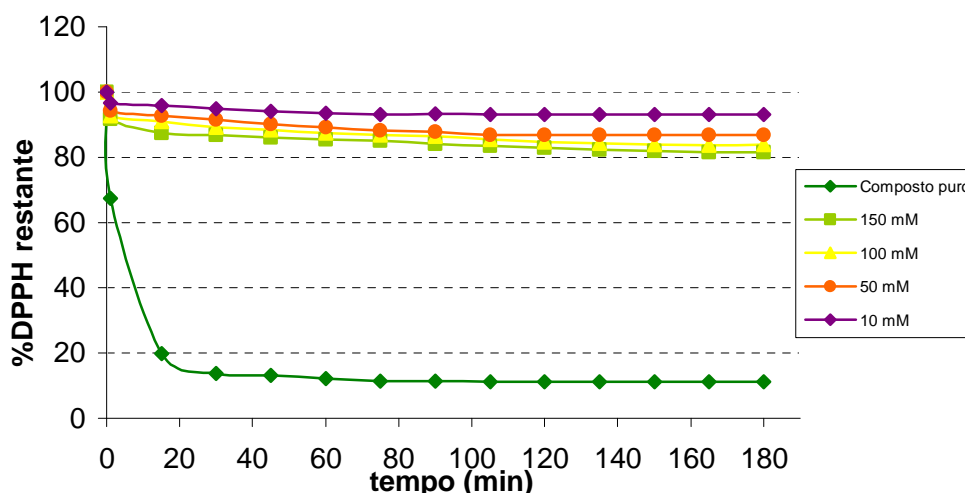
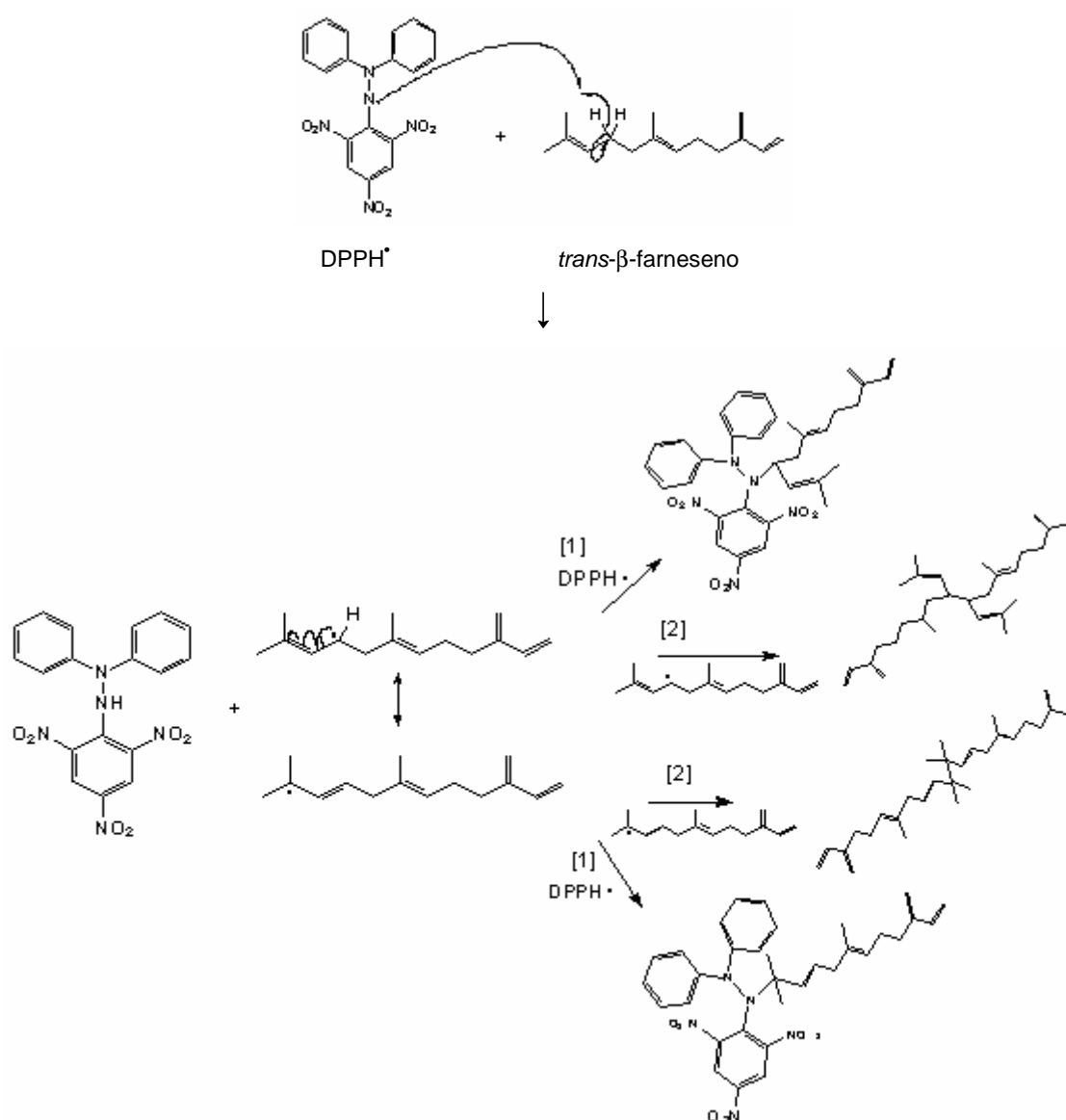


Figura 25 - Comportamento cinético das diferentes soluções de *trans*-β-farneseno usadas e do padrão puro.

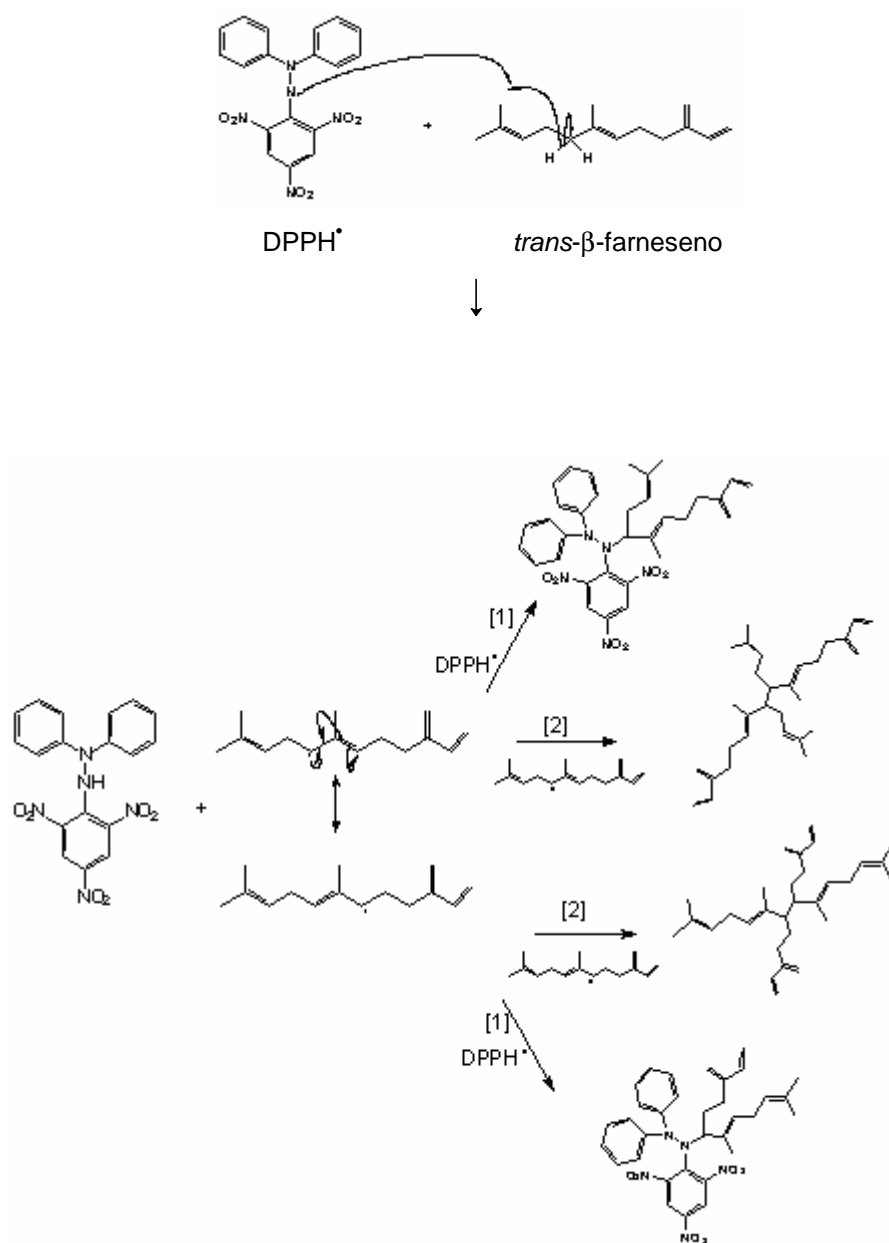
Pela figura 25 é possível verificar que o *trans*-β-farneseno apresenta um comportamento semelhante entre todas as concentrações das soluções analisadas, ocorrendo uma diminuição muito gradual ao longo do tempo, apresentando estas, uma cinética lenta. Quanto à actividade antioxidante, que se pode avaliar através do declínio da percentagem de DPPH[•] restante para o padrão puro, esta é elevada. No entanto, para as concentrações utilizadas, não

foi possível determinar nem o EC_{50} nem o ARP. O mecanismo proposto, na figura 26 para a reacção entre o *trans*- β -farneseno e o DPPH \cdot baseia-se no ataque por parte do átomo de azoto do DPPH com um electrão desemparelhado às duplas ligações do *trans*- β -farneseno. Como o *trans*- β -farneseno possui quatro posições alílicas, então existe a possibilidade de formação de oito radicais, resultantes da reacção com o DPPH \cdot . No entanto, destes, só dois é que apresentam o radical num carbono terciário, sendo possivelmente estes que se formam em maior quantidade.

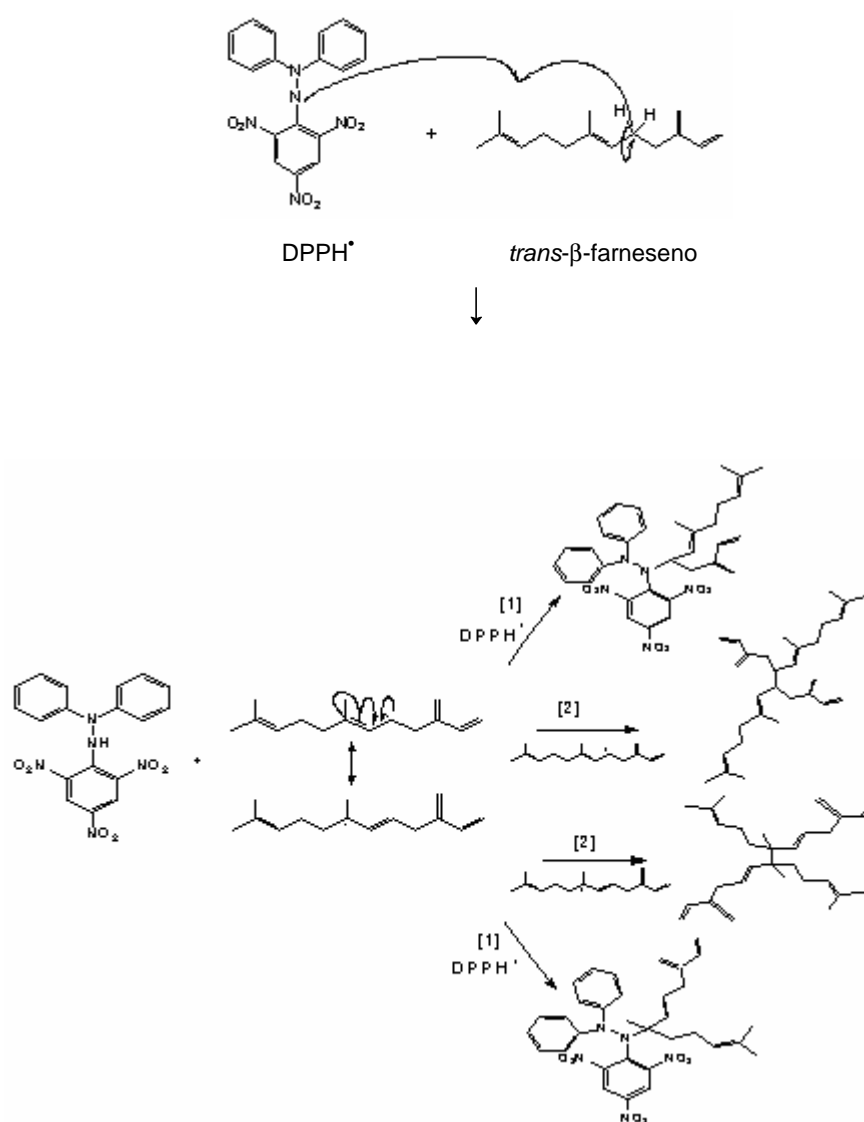
1) Formação de radical secundário e respectiva estabilização a radical terciário e possíveis produtos finais resultantes da reacção com DPPH \cdot .



2) Formação de radicais secundários e possíveis produtos finais resultantes da reacção com DPPH[•].



3) Formação de radical secundário e respectiva estabilização a radical terciário e possíveis produtos finais resultantes da reacção com DPPH[•].



4) Formação de radicais secundários e possíveis produtos finais resultantes da reacção com DPPH[•].

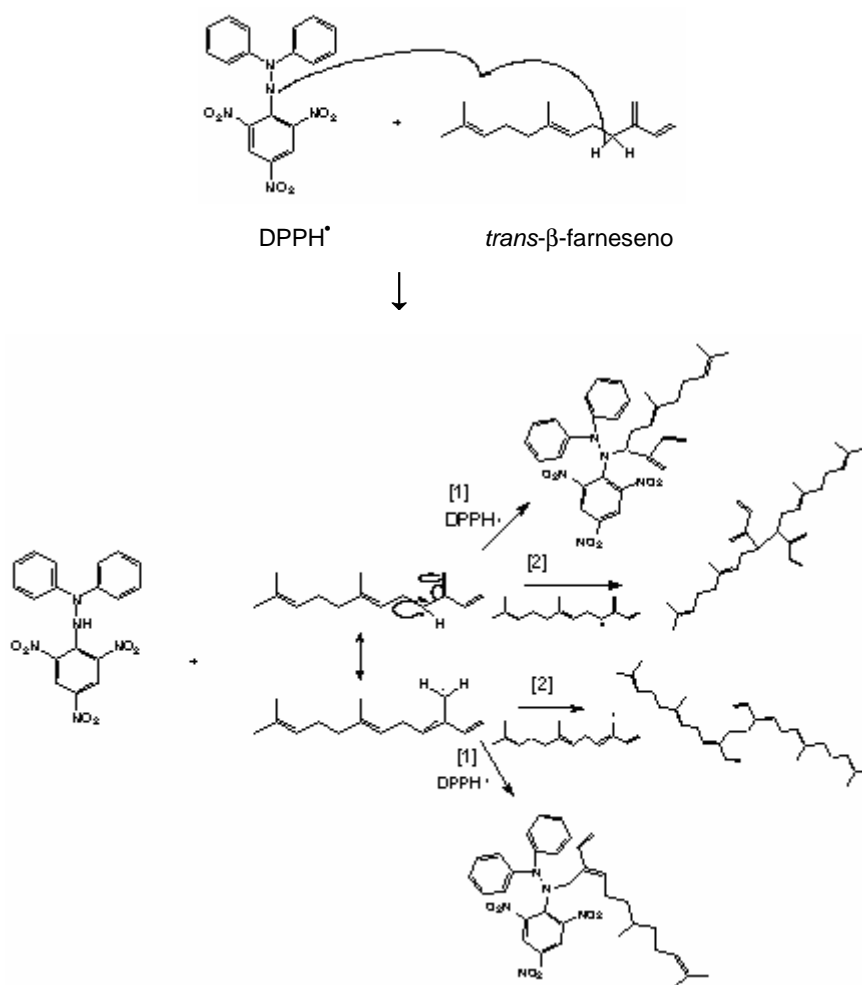


Figura 26 - Potenciais mecanismos reaccionais entre o *trans*-β-farneseno e o DPPH[•] (baseado em 45). Reacção [1] complexação; reacção [2] dimerização.

A figura 27 mostra o comportamento cinético do α-bisabolol, com base na diminuição da quantidade de DPPH[•] que não reagiu.

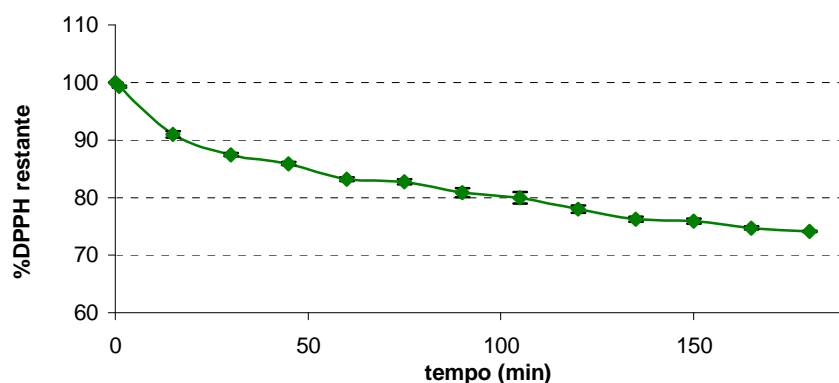
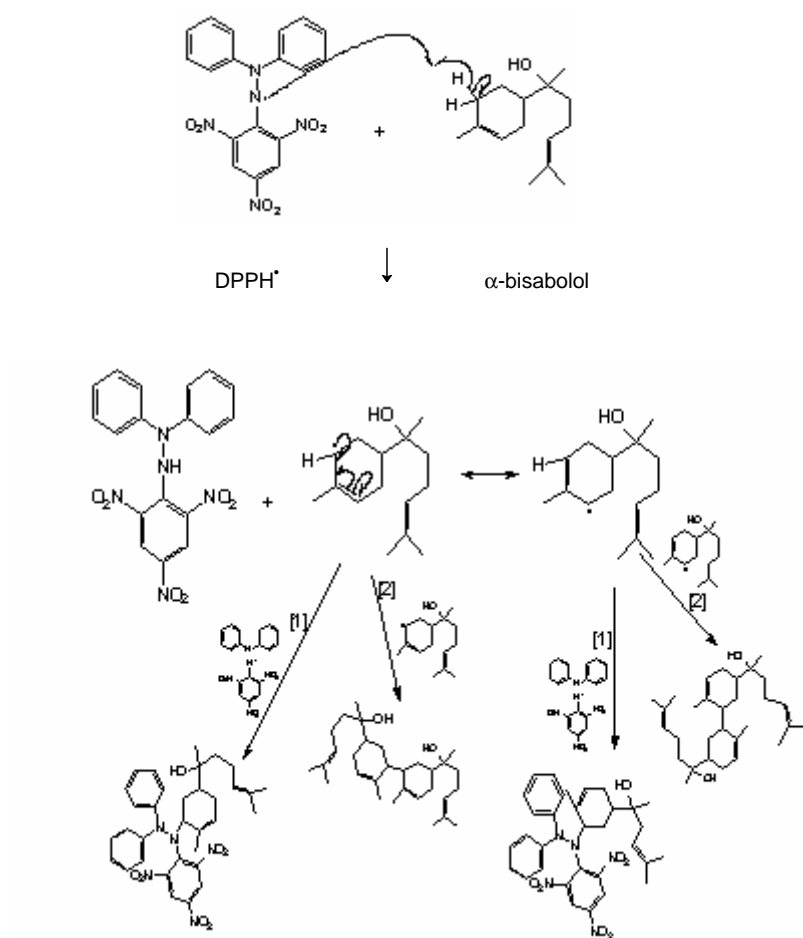


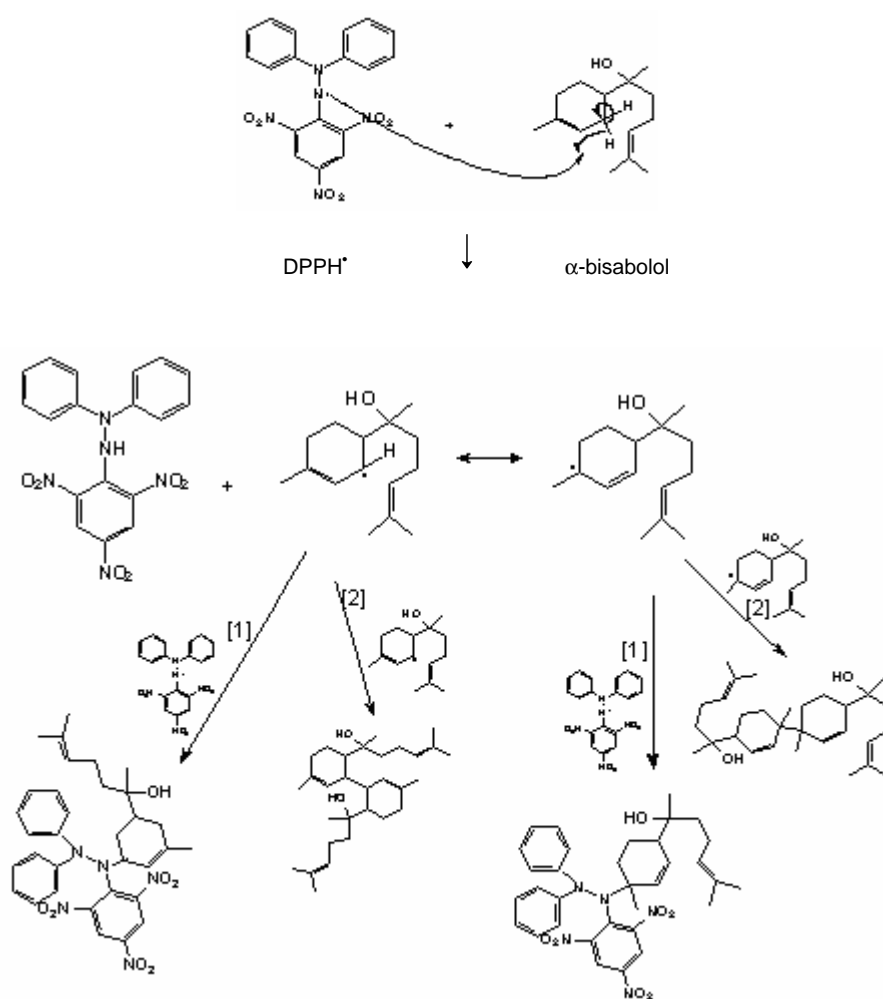
Figura 27 - Comportamento cinético do α -bisabolol.

Pode observar-se pela figura 27 que o α -bisabolol possui uma baixa actividade antioxidante, apresentando uma cinética lenta, já que a % DPPH[•] restante vai diminuindo lentamente até atingir os 74,1% ao fim de 180 minutos. Como a % DPPH[•] restante não atinge os 50%, não é possível calcular o seu EC₅₀ e, conseqüentemente, o ARP, pois a sua actividade antiradicalar é baixa, reagindo muito pouco com o radical, DPPH[•]. No entanto, como o α -bisabolol apresenta três carbonos em posições alílicas, é possível apresentar uma proposta de mecanismo reaccional entre o padrão e o radical (Figura 28), através da reacção entre o átomo de azoto do DPPH[•] que possui o electrão desemparelhado e os hidrogénios dos referidos carbonos em posição alílica do α -bisabolol. Pela bibliografia, sabe-se que para cada carbono em posição alílica, formam-se dois radicais, então, para o α -bisabolol, existe a possibilidade de se formarem seis radicais. No entanto, destes, só dois é que apresentam o radical num carbono terciário, sendo possivelmente estes que se formam em maior quantidade, pois são radicais mais estáveis, formando por isso, produtos também mais estáveis. A figura 28 mostra uma proposta de mecanismos para a formação dos três radicais possíveis de se formarem para o α -bisabolol (47).

76



2) Formação de radical secundário e respectiva estabilização a radical terciário e possíveis produtos finais resultantes da reacção com DPPH[•].



3) Formação de radical secundário e respectiva estabilização a radical terciário e possíveis produtos finais resultantes da reacção com DPPH[•].

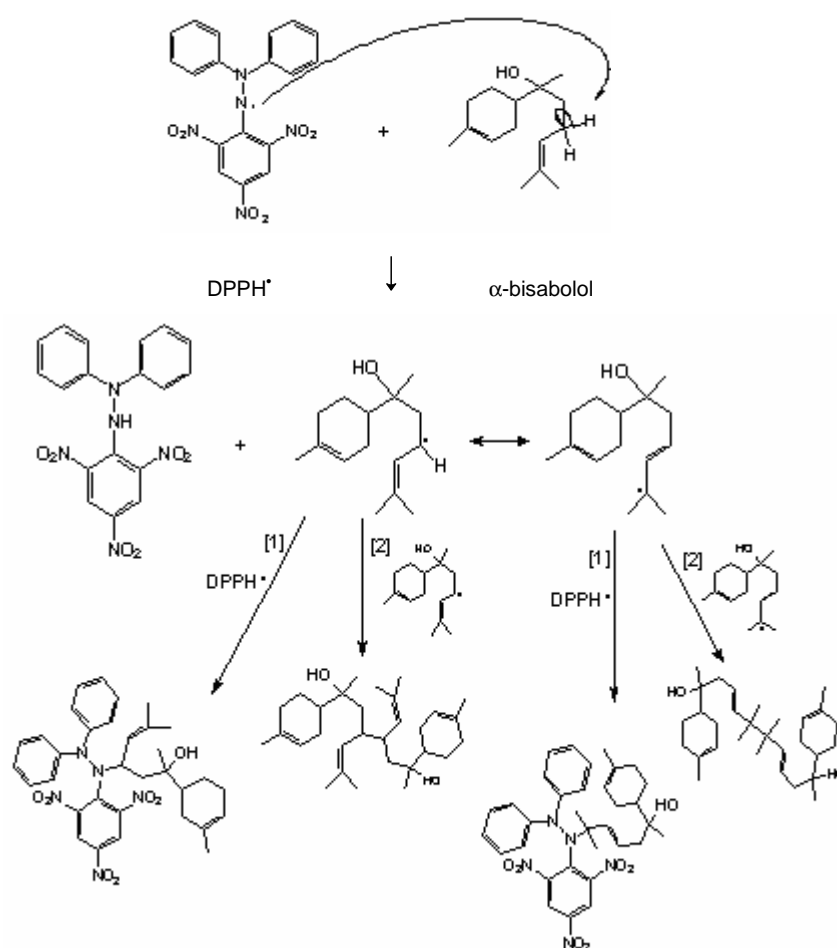


Figura 28 - Potenciais mecanismos reaccionais entre o α-bisabolol e o DPPH[•] (baseado em 45). Reacção [1] complexação; Reacção [2] dimerização.

A figura 29 mostra o comportamento cinético do aromadendreno, com base na diminuição da quantidade de DPPH[•] que não reagiu.

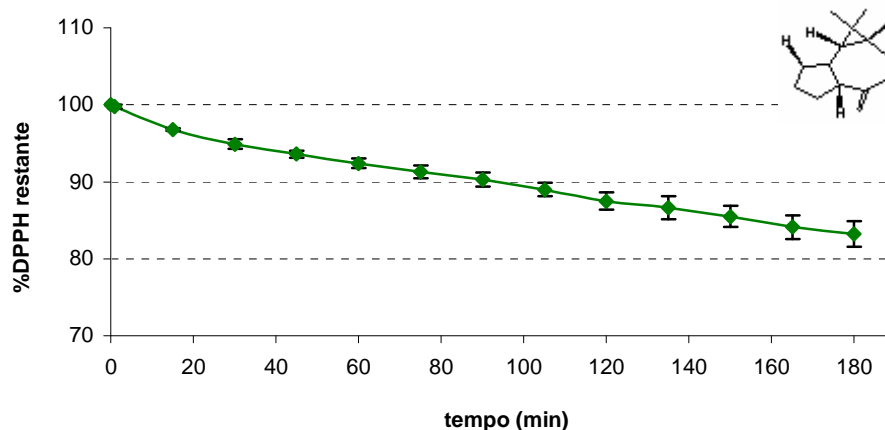


Figura 29 - Comportamento cinético do aromadendreno.

Pode observar-se pela análise da figura 29 que o aromadendreno possui uma baixa actividade antioxidante, apresentando uma cinética lenta, já que a % DPPH[•] restante vai diminuindo lentamente até atingir os 83,2% ao fim de 180 minutos. Como a % DPPH[•] restante não atinge os 50%, não é possível calcular o seu EC₅₀ e, consequentemente, o ARP.

A figura 30 mostra o comportamento cinético do α -cedreno, com base no declínio percentagem de DPPH[•] que não reagiu.

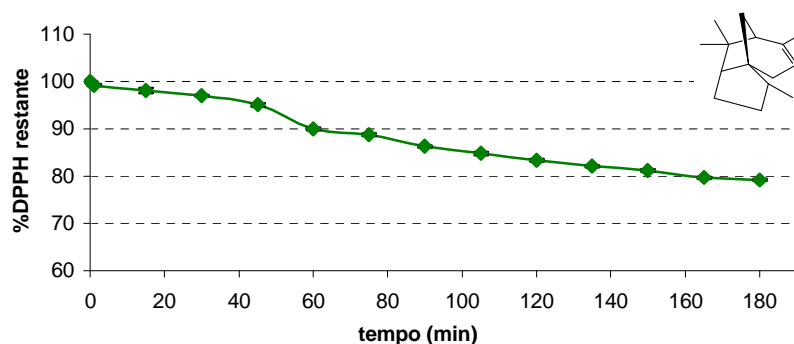


Figura 30 - Comportamento cinético de α -cedreno.

Pela figura 30 verifica-se que o α -cedreno possui uma baixa actividade antioxidante, apresentando uma cinética lenta, já que a % DPPH[•] restante vai diminuindo lentamente até atingir os 79,2% ao fim de 180 minutos. Como a % DPPH[•] restante não atinge os 50%, não é possível calcular o seu EC₅₀ e, consequentemente, o ARP.

A figura 31 mostra o comportamento cinético do *trans*-cariofileno, com base no declínio percentagem de DPPH[•] que não reagiu.

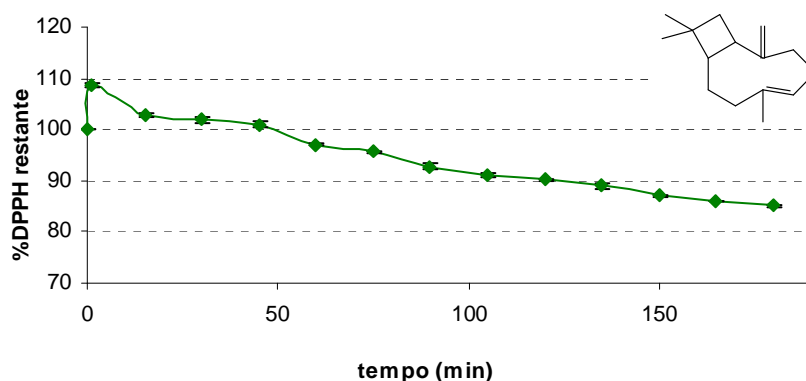


Figura 31 - Comportamento cinético do *trans*-cariofileno.

Pode observar-se pela figura 31 que o *trans*-cariofileno possui uma baixa actividade antioxidante, apresentando uma cinética lenta, já que a % DPPH[•] restante vai diminuindo lentamente até atingir os 85,2% ao fim de 180 minutos. Como a % DPPH[•] restante não atinge os 50%, não é possível calcular o seu EC₅₀ e, conseqüentemente, o ARP.

Pela análise do comportamento cinético realizada para os 5 compostos terpénicos em estudo (padrões) conclui-se que, segundo o método de DPPH[•] para avaliar a actividade antioxidante, os padrões analisados apresentam uma cinética lenta, não sendo possível para nenhum deles determinar o EC₅₀ e respectivo ARP. A excepção é o *trans*-β-farneseno cujo padrão puro apresentou maior actividade antioxidante, pois a sua cinética mostrou ser bastante rápida, estabilizando a reacção com o radical DPPH[•] logo ao fim de sensivelmente, 20 minutos. Contudo, para este padrão, também não foi possível determinar o EC₅₀ e respectivo ARP, visto que para a gama de concentrações utilizada, este composto apresentou uma cinética lenta, pois a % de DPPH[•] restante vai diminuindo lentamente até atingir os 81,5, 83,9, 86,8 e 93,1%, para as concentrações de 150, 100, 50 e 10 mM, respectivamente, ao fim dos 180 minutos de reacção.

5. CONCLUSÕES

A metodologia de HS-SPME/GC–qMS usada permitiu analisar a composição sesquiterpénica de 15 populações de inflorescências de camomila obtidas a partir de culturas biológica e convencional, provenientes de diferentes zonas geográficas e de diferentes anos de colheita. A metodologia usada permitiu não só a extracção dos sesquiterpenóides mas também a restante parte volátil pertencente à matriz da amostra. No âmbito deste trabalho, apenas foram estudados os resultados relativos aos compostos sesquiterpénicos, sendo detectados 27 compostos, correspondendo a estruturas de tipo hidrocarboneto [18], álcool [4], cetona [1] e respectivos óxidos [4].

Para as 15 populações de camomila analisadas, o composto maioritário é o *trans*- β -farneseno, com excepção das amostras B4, B5 e B6, cujos compostos maioritários são o ar-curcumeno, o óxido de bisabolol A e o espatulenol, respectivamente. Com excepção da amostra B4, as populações de camomila apresentam em comum compostos como o *trans*- β -farneseno, o α -bisabolol e os óxidos de bisabolol A e B, cujos efeitos biológicos são muito importantes e conhecidos (15).

Os sesquiterpenóides são metabolitos secundários, cuja biogénese se encontra condicionada por vários factores como o tipo de cultura, o clima, a fauna e flora vizinhas e o tipo de solo (2). Neste estudo verificou-se que existe diferença entre os dois tipos de cultura relativamente à composição em sesquiterpenóides totais: as populações de cultura convencional apresentam maior teor em sesquiterpenóides totais. Tendo em conta a composição em bisabolóides, pode-se definir o quimiotipo das populações analisadas. Verifica-se que todas as populações de camomila pertencem ao quimiotipo do óxido de bisabolol B, com excepção da amostra B1 que apresenta áreas similares para ambos os óxidos.

O sesquiterpeno β -selineno surge em culturas geneticamente modificadas (17). Como no Brasil não se usam sementes geneticamente modificadas e como este composto aparece em B2 e C3, é possível que nestas variedades haja a ocorrência *in vivo* de um processo biossintético activo para este composto em populações não geneticamente modificadas. Também na bibliografia tem sido referido que o β -eudesmol é característico de populações selvagens (17), o que não se verifica aqui. Nas 15 populações de camomila

estudadas, apenas as populações de cultura convencional (C1, C2, C3 e C4) apresentam este sesquiterpenol. Para além destas populações serem todas de cultura convencional, elas também provêm da região norte do Estado do Paraná. Isto pode sugerir a ocorrência *in vivo* de um processo biossintético activo para este composto.

Esta metodologia permite estabelecer o perfil em sesquiterpenóides das populações de camomila e pode ser usada para avaliar o potencial biológico da planta.

A futura valorização da *Matricaria recutita* L., pode ser estendida a outros sesquiterpenóides que ainda não foram estudados nesta matriz, mas que são conhecidos noutros produtos naturais, como frutos e plantas (19, 21).

Apesar de se poder estabelecer que amostras têm maior valor biológico apenas com a metodologia utilizada, é possível fazer uma quantificação efectiva utilizando padrões dos sesquiterpenóides. No entanto, optou-se por fazer apenas a quantificação do α -bisabolol. Para estimar o teor de α -bisabolol nas amostras de camomila foi usado o método de adição padrão aplicado às inflorescências. Segundo este método foi avaliada a quantidade de α -bisabolol emitido para o espaço de cabeça. O método de adição do padrão apresenta como vantagem o facto de se poder fazer aplicação directa do método, sem ser necessário recorrer a uma extracção prévia do composto em estudo, e permite eliminar os efeitos de matriz. No entanto, torna-se um método moroso, demorando cerca de 30 horas por amostra.

De acordo com a composição em sesquiterpenóides, os resultados obtidos, no presente trabalho, abrem novas oportunidades para a valorização de *Matricaria recutita* L. Considerando o potencial farmacológico e/ou fitoterapêutico da *Matricaria recutita* L., a implementação da metodologia em estudo, pode representar uma ferramenta poderosa na caracterização e controlo deste produto natural, contribuindo, assim, para a valorização deste produto vegetal, o que permite incrementar a confiança do mercado bem como o seu consumo.

Nos métodos utilizados para obtenção de extractos enriquecidos em sesquiterpenóides, verificou-se que após as amostras serem sujeitas a alta pressão isostática há um aumento da extractabilidade dos sesquiterpenóides, o que possibilitou a identificação de um maior número de compostos. Quanto à

aplicação da extracção com CO₂ supercrítico às inflorescências de camomila, verificou-se que este método possibilita a obtenção de extractos enriquecidos em bisabolóides. Estas técnicas mostram-se bastante promissoras no tratamento prévio de produtos naturais pois permitem aumentar a extractabilidade dos compostos, nomeadamente, dos sesquiterpenóides. Assim, estes métodos surgem como metodologias de preparação de amostras que podem ser combinadas para que se conseguia obter extractos enriquecidos em sesquiterpenóides.

Quanto à avaliação do potencial antioxidante dos cinco compostos terpénicos estudados (padrões) conclui-se que, segundo o método de DPPH[•] estes apresentam uma cinética lenta, não sendo possível para nenhum deles determinar o EC₅₀ e respectivo ARP. A excepção é o *trans*-β-farneseno cujo padrão puro apresentou maior actividade antioxidante, pois a sua cinética mostrou ser bastante rápida, estabilizando a reacção com o radical DPPH[•] logo ao fim de sensivelmente, 20 minutos. Contudo, para este padrão, também não foi possível determinar o EC₅₀ e respectivo ARP, visto que para a gama de concentrações utilizada, este composto apresentou uma cinética lenta.

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) M. Repcak, J. Imrich, J. Garcar, *Quantitative Evaluation of the main sesquiterpenes and polyacetylenes of Chamomilla recutita essential oil by high-performance liquid chromatography*, *Phytochem. Anal.* 10 (1999), 335-338.
- (2) É. Szoke, E. Máday, E. Tyihák, I. N. Kuzovkina, É. Lemberkovics, *New terpenoids in cultivated and wild chamomile (in vivo and in vitro)*, *J. Chromatogr. B*, 800 (2004), 231-238.
- (3) M. Medic-Saric, G. Stanic, Z. Males, S. Sasic, *Application of numerical methods to thin-layer chromatographic investigation of the main components of chamomile (Chamomilla recutita (L.) Rauschert) essential oil*, *J. Chromatogr. A*, 776 (1997), 335-360.
- (4) J. K. Srivastava S. Gupta, *Antiproliferative and Apoptotic effects of Chamomille extract in various human cancer cells*, *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007), 9470-9478.
- (5) A. Gomaa, T. Hashem, M. Mohamed, E. Ashry, *Matricaria chamomilla extract inhibits both development of morphine dependence and expression of abstinence syndrome in rats*, *J. Pharmacol. Sci.* 92 (2003), 50-55.
- (6) A. Raal, E. Arak, A. Orav, K. Ivask, *Comparison of essential oil content of Matricaria recutita L. from different origins*, *Ars Pharmaceutica*, 44 (2003), 159-165.
- (7) T. Balazs, R. Tisserand, *German chamomile*, *Int. J. Aromatherapy*, 9 (1998), 15-21.
- (8) A. Orav, T. Kailas, K. Ivask, *Volatile Constituents of Matricaria recutita L. from Estonia*, *Proc. Estonia Acad. Sci. Chem.*, 50 (2001), 39-45.
- (9) M. Ganzera, P. Schneider, H. Stuppner, *Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (Matricaria recutita L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes*, *Life Sci.*, 78 (2006), 856-861.
- (10) F. N. Fonseca, M. F. M. Tavares, C. Horv'ath, *Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of Chamomilla recutita*, *J. Chromatogr. A*, 1154 (2007), 390-399.
- (11) E. Cavalieri, S. Mariotto, C. Fabrizi, A. Carcereri de Prati, R. Gotardo, α -bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315 (2004), 589-594.

- (12) C. Wagner, W. Friedt, R. A. Marquard, F. Ordon, *Molecular analyses on the genetic diversity and inheritance of (-)- α -bisabolol and chamazulene content in tetraploid chamomile (Chamomilla recutita (L.) Rausch.)*, Plant Sci. 169 (2005), 917-927.
- (13) K. V. Sashidhara, *Essential oil composition of Matricaria recutita L. from the lower region of the Himalayas*, Flavour and Fragrance Journal, 21 (2006), 274-276.
- (14) K. J. Waleczek, *Phase solubility studies of pure (-)- α -bisabolol and camomile essential oil with β -cyclodextrin*, E.J.P.B., 55 (2003), 247-251.
- (15) L. Perbellini, *Determination of alpha-bisabolol in human blood by micro-HPLC-ion trap MS and head space-GC-MS methods*, J. Chromatogr. B, 812 (2004) 373-377.
- (16) K. P. Adam, R. Thiel, J. Zapp, *Incorporation of 1-[1- ^{13}C]Deoxy D-Xylulose in Camomile Sesquiterpenes*, Arch. Biochem. Biophys., 369 (1999), 127-132.
- (17) É. Szoke, E. Máday, J. Gershenzon, É. Lemberkovics, *Terpenoids in Genetically Transformed Cultures of Chamomile*, Chromatogr. 60 (2004), S269-S272.
- (18) M. O. Prates, T. A. Pizziolo, A. G. Tôrres, E. C. Melo, *Modelagem matemática de um sistema de secagem de plantas medicinais e aromáticas*, em Engenharia na Agricultura, Viçosa: UFV, 2007, vol. 15, n. 2, 96-108.
- (19) J. Govinden-Soulange, N. Magan, A. Gurib-Fakim, A. Gauvin, J. Smadja, H. Kodja, *Chemical Composition and in vitro Antimicrobial Activities of the Essential Oils from Endemic *Psiadia* Species Growing in Mauritius*, Biol. Pharm. Bull. 27 (2004) 1814-1818.
- (20) J.R. Kuate, A.A. Tsona, J. Foko, J.M. Bessiere, C. Menut, P.H.A. Zollo, *Chemical Composition and in vitro Antifungal Properties of Essential Oils from Leaves and Flowers of *Erigeron fl oribundus* (H.B. et K.) Sch. Bip. from Cameroon*, J. Essent. Oil Res. 17 (2005) 261-264.
- (21) M. Miyazawa, Y. Nakamura, Y. Ishikawa, *Insecticidal sesquiterpene from *Alpinia oxyphylla* against *Drosophila melanogaster**, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 3639-3641.

- (22) R. Belardi, J. Pawliszyn, *The application of chemically modified fused silica fibers in extraction of organics from water matrix samples, and their rapid transfer to capillary column*, Water Pollut. Res. J. Can., 24 (1989), 179-191.
- (23) Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Headspace Solid-Phase Microextraction*, Anal. Chem., 65 (1993), 1843-1852.
- (24) C. L. Arthur, J. Pawliszyn, *Solid-Phase microextraction with thermal desorption using fused optical fibers*, Anal. Chem., 62 (1990), 2145-2148.
- (25) H. L. Lord, J. Pawliszyn, *Evolution of solid-phase microextraction technology-Review*, J. Chromatogr. A, 885 (2000), 153-193.
- (26) C. Almeida, P. Rosário, P. Serôdio, J. M. F. Nogueira, *Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica*, Quím., 95 (2004), 69-77.
- (27) D. C. Harris, *Análise Química Quantitativa*, 6ª edição, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 2003, 583-590.
- (28) S. M. Rocha, P. Coutinho, A. Barros, I. Delgadillo, M. A. Coimbra, *Rapid tool for distinction of wines based on the global volatile signature*, J. Chromatogr. A, 1114 (2006), 188-197.
- (29) C. C. C. R. Carvalho, M. M. R. Fonseca, *Biotransformation of terpenes*, Biotech. Adv., 24 (2006), 134-142.
- (30) Y. Wang, *Sample preparation / concentration for trace analysis in GC / MS (A study of solid phase microextraction and headspace sampling)*, Dissertation submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, U.S.A., 1997.
- (31) S. Rocha, V. Ramalheira, A. Barros, I. Delgadillo, M. A. Coimbra, *Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Retention Factors in a Wine Model*, J. Agric. Food Chem, 49 (2001), 5142-5151.
- (32) H. J. C. Neves, A. M. C. Freitas, *Introdução à cromatografia gás-líquido de alta resolução*, Dias de Sousa, LDA, 1ª edição, 1996, 11-121.
- (33) F. G. Kitson, B. S. Larsen, C. N. McEwen, *Gas chromatography and Mass spectrometry – A practical guide*, Academic Press, 1996, Capítulos 1 e 3.

- (34) E. Coelho, S. M. Rocha, I. Delgadillo, M. A. Coimbra, *Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during Vitis vinifera L. Cv. 'Baga' ripening*, Anal. Chim. Acta, 563 (2006), 204-214.
- (35) T. Górecki, X. Yu, J. Pawliszyn, *Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres*, Analyst, 124 (1999), 643-649.
- (36) J. A. Guerrero-Beltrán, G. V. Barbosa-Cánovas, B. G. Swanson, *High Hydrostatic Pressure Processing of Fruit and Vegetable Products*, Food Res. Int., 21 (2005), 411-425.
- (37) A. M. Matser, B. Krebbers, R. W. Van der Berg, P. V. Bartels, *Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products*, Food Sci. Technol., 15 (2004), 79-85.
- (38) I. Oey, I. Van der Plancken, A. Van Loey, M. Hendrickx, *Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems?- review*, Trends Food Sci. Technol., 19 (2008) 300-308.
- (39) D. N. Sila, T. Duvetter, A. Roeck, I. Verlent, Ch. Smout, G. K. Moates, B. P. Hills, K. K. Waldron, M. Hendrickx, A. Van Loey, *Texture changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing - review*, Trends Food Sci. Technol., 19 (2008) 309-319.
- (40) G. V. Barbosa-Canovas, M. S. Tapia, M. P. Cano, *Novel Food Processing Technologies*, CRC Press 2004, em *Advances in Use of High Pressure to Processing and Preservation of Plant Foods*, capítulo 13, 283-309.
- (41) I. Zizovic, M. Stamenic, A. Orlovic, D. Skala, *Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale*, J. Supercrit. Fluids, 39 (2007), 338-346.
- (42) C. L. Phelps, N. G. Smart, C. M. Wai, *Past, Present, and Possible Future Applications of Supercritical Fluid Extraction Technology*, J. Chem. Educ., 73 (1996), 1163-1168.
- (43) M. Raventós, S. Duarte, R. Alarcón, *Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview*, Food Sci. Tech. Int., 8 (2002), 269-284.
- (44) N. P. Povh, M. O. M. Marques, M. A. A. Meireles, *Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (Chamomilla recutita [L.] Rauschert)*, J. Supercrit. Fluid, 21 (2001), 245-256.

- (45) D. L. Madhavi, S. S. Deshpande, D. K. Salunkhe, *Food Antioxidants Technological, Toxicological and Health Perspectives*, Marcel Dekker, 1996, capítulo 3.
- (46) C. Porto, S. Calligaris, E. Celotti, M. C. Nicoli, *Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH[•] test*, J. Agric. Food Chem., 48 (2000), 4241-4245.
- (47) W. Brand-Williams, M.E. Cuveleir, C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*, Lebensm. Wiss. u. Technol., 28 (1995), 25-30.
- (48) M. S. Rahman, *Handbook of Food Preservation*, 1ªEdição; USA; Marcel Dekker., 1998, 533-569.
- (49) D. C. Harris, *Análise Química Quantitativa*, 2003, 6ª edição, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 583-590.
- (50) D. Huang, O. Boxin, R. L. Prior, *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assay*, J. Agric. Food Chem., 53 (2005), 1841-1856.
- (51) C. Bicchi, Ch. Cordero, E. Liberto, B. Sgorbini, P. Rubiolo, *Reliability of fibres in solid-phase microextraction for routine analysis of the headspace of aromatic and medicinal plants*, J. Chromatogr. A, 1152 (2007) 138-149.
- (52) P. Rubiolo, F. Belliardo, Ch. Cordero, E. Liberto, B. Sgorbini, C. Bicchi, *Headspace–Solid-phase Microextraction Fast GC in Combination with Principal Component Analysis as a Tool to Classify Different Chemotypes of chamomile flower-heads (Matricaria recutita L.)*, Phytochem. Anal. 17 (2006), 217-225.

7. ANEXOS

Anexo I

**Áreas cromatográficas obtidas por HS-SPME/GC–qMS, para
estimativa do teor de α -bisabolol nas inflorescências de camomila,
segundo o método de adição do padrão.**

1. Método de adição padrão aplicado às inflorescências

Para a estimativa do teor de α -bisabolol pelo método da adição do padrão, as concentrações das soluções padrão usadas foram 3,866 mg/L; 8,939 mg/L e 16,91 mg/L, ou seja, as concentrações nos 50 μ L usados na adição do padrão foram 1,518 μ g/L; 3,511 μ g/L e 6,695 μ g/L. A tabela 16 mostra os resultados obtidos das áreas cromatográficas em função da concentração e respectiva massa de α -bisabolol adicionado, para as diferentes populações de camomila, obtidas por HS-SPME/GC–qMS.

Tabela 14 - Registo da área cromatográfica em função da concentração e respectiva massa de padrão adicionado, para as diferentes populações de camomila, obtidas por HS-SPME/GC–qMS.

Áreas cromatográficas (u.a.)									
μ g/L α -bisabolol adicionado	ng de α -bisabolol adicionado	Orgânica (B1)	PR (B5)	ANG (B7)	RE (C3)	Pró-Vida (C5)	Tv (C6)	R (C7)	CC (C8)
0	0	2,5E+07	3,8E+07	4,2E+07	1,9E+07	1,3E+07	4,8E+07	2,3E+07	6,2E+07
0	0	1,9E+07	4,3E+07	4,3E+07	2,0E+07	8,6E+06	4,7E+07	2,6E+07	5,7E+07
0	0	3,0E+07	4,4E+07	4,7E+07	1,6E+07	7,6E+06	4,6E+07	2,4E+07	6,1E+07
1,518	0,076	5,9E+07	5,6E+07	5,9E+07	3,0E+07	2,0E+07	6,4E+07	3,4E+07	8,0E+07
1,518	0,076	5,5E+07	6,4E+07	6,2E+07	3,2E+07	2,8E+07	6,4E+07	2,9E+07	7,7E+07
1,518	0,076	5,2E+07	6,7E+07	6,1E+07	3,5E+07	3,2E+07	6,3E+07	3,4E+07	7,9E+07
3,511	0,176	1,5E+08	1,1E+08	7,6E+07	6,4E+07	3,9E+07	8,5E+07	4,0E+07	1,2E+08
3,511	0,176	1,6E+08	1,2E+08	7,1E+07	5,3E+07	4,2E+07	8,7E+07	4,0E+07	1,0E+08
3,511	0,176	1,7E+08	1,1E+08	7,3E+07	6,1E+07	4,5E+07	8,7E+07	4,2E+07	1,1E+08
6,695	0,335	2,5E+08	1,6E+08	1,2E+08	7,6E+07	7,2E+07	1,3E+08	6,5E+07	2,1E+08
6,695	0,335	2,1E+08	1,7E+08	1,2E+08	8,2E+07	8,8E+07	1,3E+08	6,8E+07	1,8E+08
6,695	0,335	2,2E+08	1,6E+08	1,2E+08	8,9E+07	8,2E+07	1,3E+08	6,6E+07	6,2E+07

1.1 Exemplo do raciocínio seguido para determinação do teor de α -bisabolol para a amostra de camomila RE (C3).

Tabela 15 - Registo da área cromatográfica em função da concentração do padrão adicionado.

C padrão (µg/L)	Área cromatográfica do α -bisabolol (u.a.)
0,000	1,9E+07
0,000	2,0E+07
0,000	1,6E+07
1,518	3,0E+07
1,518	3,2E+07
1,518	3,5E+07
3,511	6,4E+07
3,511	5,3E+07
3,511	6,1E+07
6,695	7,6E+07
6,695	8,2E+07
6,695	8,9E+07

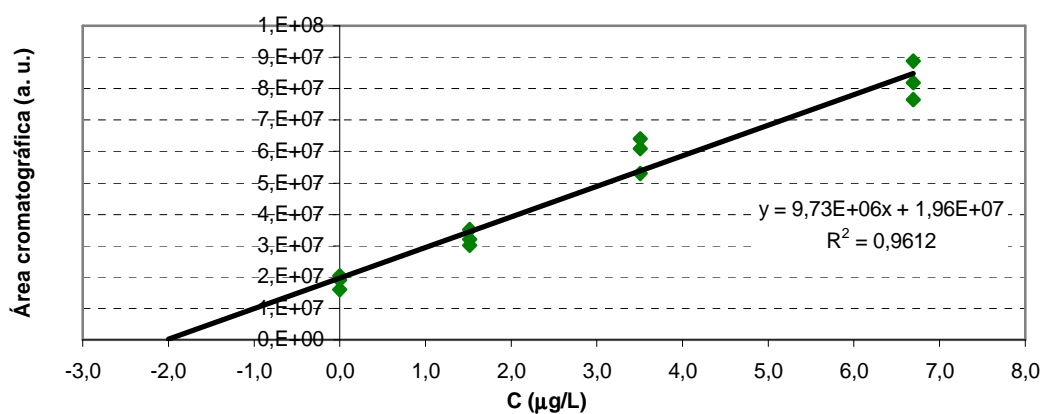


Figura 32 - Curva de calibração do α -bisabolol (área cromatográfica vs concentração do padrão adicionado).

Deste modo, pelo conceito do método da adição do padrão e pela equação da recta obtida vem que, a concentração do α -bisabolol na amostra de camomila RE (C3), corresponde ao valor onde a recta intersecta o eixo das abcissas. Assim, substituindo na equação o valor de y por zero vem:

Para $y=0$, em que y é o valor das áreas cromatográficas

$$x = 0 - 1,96E+07 / 9,73+06$$

$$x = 2,01 \mu\text{g/L}$$

Ou seja, a concentração do α -bisabolol na amostra de camomila RE é de $2,01 \mu\text{g/L}$. No entanto, este valor tem que ser expresso em μg de α -bisabolol/g de camomila. Assim, é necessário determinar qual a massa de α -bisabolol, adicionada à amostra de camomila.

Tabela 16 - Registo da área cromatográfica em função da massa de padrão adicionado.

m (ng)	Área cromatográfica (a.u.)
0,0000	1,9E+07
0,0000	2,0E+07
0,0000	1,6E+07
0,0759	3,0E+07
0,0759	3,2E+07
0,0759	3,5E+07
0,176	6,4E+07
0,176	5,3E+07
0,176	6,1E+07
0,335	7,6E+07
0,335	8,2E+07
0,335	8,9E+07

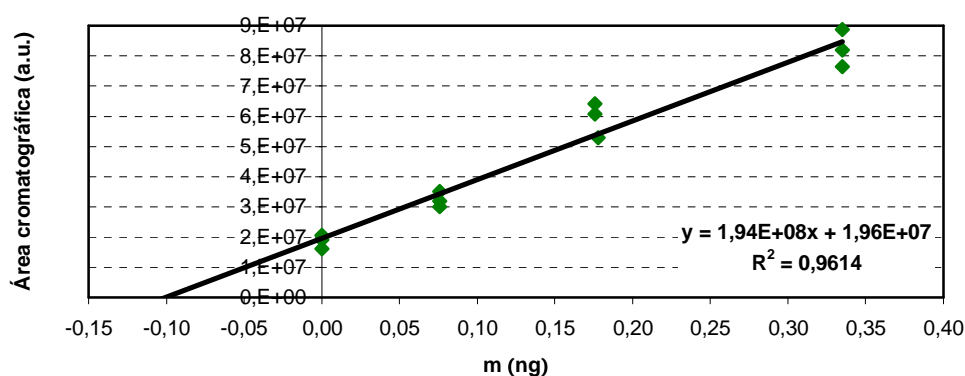


Figura 33 - Curva de calibração do α -bisabolol (área cromatográfica vs massa do padrão adicionado).

Assim, substituindo na equação o valor de y por zero vem:

$$x = 0 - 1,96E+07 / 1,94E+08$$

$$x = 1,01E-1 \text{ ng} \Leftrightarrow x = 0,10 \text{ ng de } \alpha\text{-bisabolol}$$

Ou seja, a massa de α -bisabolol na amostra de camomila RE é de $1,01\text{E-}1$ ng. No entanto, este valor tem que ser expresso em ng de α -bisabolol/g de camomila. Assim,

$$\begin{array}{rcl} 1,01\text{E-}1 \text{ ng de bisabolol} & \text{-----} & 2 \text{ g de camomila} \\ x & \text{-----} & 1 \text{ g de camomila} \\ x = 5,05\text{E-}2 \text{ ng de } \alpha\text{-bisabolol/g de camomila} \end{array}$$

Então, a camomila RE apresenta $0,051\text{ ng } \alpha\text{-bisabolol/g de camomila}$.

Anexo II

**Absorvâncias obtidas para os padrões em estudo em função da
percentagem de DPPH[•] restante, para avaliação da actividade
antioxidante.**

Tabela 17 - Absorvâncias obtidas em função da percentagem de DPPH* restante, para o aromadendreno

Tempo (min.)	Réplica nº 1		Réplica nº 2		Réplica nº 3		Média A ₅₁₅	Média %DPPH restante	Desvio padrão
	A ₅₁₅	% DPPH* restante	A ₅₁₅	% DPPH* restante	A ₅₁₅	% DPPH* restante			
0	0,766	100	0,766	100,00	0,766	100	0,766	100	0,000
1	0,766	100	0,763	99,5	0,765	99,8	0,765	99,8	0,252
15	0,748	96,8	0,746	96,5	0,748	96,8	0,748	96,8	0,173
30	0,740	95,4	0,733	94,2	0,737	94,9	0,737	94,9	0,603
45	0,732	94,0	0,727	93,1	0,730	93,6	0,730	93,6	0,451
60	0,727	93,1	0,720	91,9	0,723	92,4	0,723	92,4	0,603
75	0,722	92,2	0,712	90,5	0,717	91,3	0,717	91,3	0,850
90	0,715	91,0	0,705	89,2	0,711	90,3	0,711	90,3	0,907
105	0,709	89,9	0,699	88,2	0,704	89,0	0,604	89,0	0,850
120	0,703	88,9	0,691	86,7	0,695	87,5	0,695	87,5	1,11
135	0,700	88,3	0,683	85,3	0,690	86,6	0,690	86,6	1,50
150	0,695	87,5	0,680	84,8	0,684	85,5	0,684	85,5	1,40
165	0,689	86,4	0,672	83,4	0,676	84,1	0,676	84,1	1,57
180	0,686	85,9	0,669	82,9	0,671	83,2	0,671	83,2	1,65

Tabela 18 - Absorvâncias obtidas em função da percentagem de DPPH* restante, para o α -bisabolol

Tempo (min.)	Réplica nº 1		Réplica nº 2		Réplica nº 3		Média A ₅₁₅	Média %DPPH restante	Desvio padrão
	A ₅₁₅	% DPPH* restante	A ₅₁₅	% DPPH* restante	A ₅₁₅	% DPPH* restante			
0	0,829	100	0,830	100	0,830	100	0,830	100	0,000
1	0,822	99,2	0,824	99,3	0,826	99,5	0,824	99,3	0,153
15	0,753	90,8	0,755	91,0	0,762	91,8	0,755	91,0	0,529
30	0,722	87,1	0,728	87,7	0,726	87,5	0,726	87,5	0,306
45	0,712	85,9	0,717	86,4	0,713	85,9	0,713	85,9	0,289
60	0,690	83,2	0,686	82,7	0,692	83,4	0,690	83,2	0,361
75	0,686	82,8	0,682	82,2	0,689	83,0	0,686	82,8	0,416
90	0,671	80,9	0,674	81,2	0,662	79,8	0,671	80,9	0,737
105	0,668	80,6	0,664	80,0	0,652	78,6	0,664	80,0	1,026
120	0,652	78,6	0,647	78,0	0,642	77,3	0,647	78,0	0,651
135	0,632	76,2	0,628	75,7	0,636	76,6	0,632	76,2	0,451
150	0,629	75,9	0,624	75,2	0,630	75,9	0,629	75,9	0,404
165	0,619	74,7	0,619	74,6	0,623	75,1	0,619	74,7	0,265
180	0,616	74,3	0,615	74,1	0,615	74,1	0,615	74,1	0,115

Tabela 19 - Absorvâncias obtidas em função da percentagem de DPPH[•] restante, para o α -cedreno.

Tempo (min.)	Réplica nº 1		Réplica nº 2		Réplica nº 3		Média A ₅₁₅	Média %DPPH restante	Desvio padrão
	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante			
0	0,831	100	0,827	100	0,830	100	0,830	100	0,000
1	0,825	99,3	0,824	99,2	0,822	98,9	0,824	99,2	0,208
15	0,815	98,1	0,813	97,3	0,817	98,3	0,815	98,1	0,529
30	0,808	97,2	0,805	96,9	0,806	97,0	0,806	97,0	0,153
45	0,794	95,5	0,789	94,9	0,790	95,1	0,790	95,1	0,306
60	0,750	90,3	0,747	89,9	0,748	90,0	0,748	90,0	0,208
75	0,735	88,4	0,738	88,8	0,740	89,0	0,738	88,8	0,306
90	0,716	86,2	0,717	86,3	0,720	86,6	0,717	86,3	0,208
105	0,702	84,5	0,708	85,2	0,705	84,8	0,705	84,8	0,351
120	0,695	83,6	0,693	83,4	0,690	83,0	0,693	83,4	0,306
135	0,680	81,8	0,682	82,1	0,683	82,2	0,682	82,1	0,208
150	0,677	81,5	0,672	80,9	0,675	81,2	0,675	81,2	0,300
165	0,661	79,5	0,662	79,7	0,664	79,9	0,662	79,7	0,200
180	0,658	79,2	0,656	78,9	0,659	79,3	0,658	79,2	0,208

Tabela 20 - Absorvâncias obtidas em função da percentagem de DPPH[•] restante, para o *trans*-cariofileno

Tempo (min.)	Réplica nº 1		Réplica nº 2		Réplica nº 3		Média A ₅₁₅	Média %DPPH restante	Desvio padrão
	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante			
0	0,831	100	0,827	100	0,830	100	0,830	100	0,000
1	0,900	108	0,901	109	0,905	109	0,902	109	0,400
15	0,850	102	0,853	103	0,852	103	0,852	103	0,430
30	0,843	101	0,847	102	0,846	102	0,845	102	0,487
45	0,835	100	0,840	102	0,837	101	0,837	101	0,555
60	0,807	97,1	0,804	97,2	0,805	97,0	0,805	97,1	0,116
75	0,793	95,4	0,791	95,6	0,795	95,8	0,793	95,6	0,180
90	0,768	92,4	0,772	93,3	0,769	92,7	0,770	92,8	0,484
105	0,753	90,6	0,757	91,5	0,754	90,8	0,755	91,0	0,480
120	0,749	90,1	0,745	90,1	0,750	90,4	0,748	90,2	0,148
135	0,735	88,4	0,739	89,4	0,741	89,3	0,738	89,0	0,504
150	0,722	86,9	0,721	87,2	0,724	87,2	0,722	87,1	0,188
165	0,716	86,2	0,712	86,1	0,714	86,0	0,714	86,1	0,069
180	0,708	85,2	0,706	85,4	0,705	84,9	0,706	85,2	0,216

Tabela 21 - Absorvâncias obtidas em função da percentagem de DPPH[•] restante, para o trans-cariofileno

Tempo (min.)	Réplica nº 1		Réplica nº 2		Réplica nº 3		Média A ₅₁₅	Média %DPPH restante	Desvio padrão
	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante			
0	0,831	100	0,827	100	0,830	100	0,830	100	0,000
1	0,560	67,4	0,562	67,6	0,561	67,5	0,561	67,5	0,100
15	0,165	19,9	0,168	20,2	0,164	19,7	0,165	19,9	0,252
30	0,119	14,3	0,114	13,7	0,115	13,8	0,115	13,8	0,321
45	0,106	12,8	0,109	13,1	0,110	13,2	0,109	13,1	0,208
60	0,100	12,0	0,102	12,3	0,101	12,2	0,101	12,2	0,153
75	0,095	11,4	0,096	11,6	0,094	11,3	0,095	11,4	0,153
90	0,094	11,3	0,093	11,2	0,094	11,3	0,094	11,3	0,058
105	0,092	11,1	0,093	11,2	0,093	11,2	0,093	11,2	0,058
120	0,092	11,1	0,093	11,2	0,093	11,2	0,093	11,2	0,058
135	0,091	11,0	0,093	11,2	0,093	11,2	0,093	11,2	0,115
150	0,091	11,0	0,093	11,2	0,093	11,2	0,093	11,2	0,115

Tabela 22 - Absorvâncias obtidas em função da percentagem de DPPH[•] restante, para o trans-β-farneseno 150 mM

Tempo (min.)	Réplica nº 1		Réplica nº 2		Réplica nº 3		Média A ₅₁₅	Média %DPPH restante	Desvio padrão
	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante			
0	0,794	100	0,792	100	0,795	100	0,794	100	0,000
1	0,729	91,8	0,727	91,8	0,730	91,8	0,729	91,8	0,016
15	0,695	87,5	0,695	87,8	0,692	87,0	0,695	87,5	0,363
30	0,689	86,8	0,690	87,1	0,689	86,7	0,689	86,8	0,237
45	0,683	86,0	0,682	86,1	0,683	85,9	0,683	86,0	0,100
60	0,678	85,4	0,681	86,0	0,679	85,4	0,679	85,4	0,338
75	0,675	85,0	0,676	85,4	0,676	85,0	0,676	85,0	0,192
90	0,668	84,1	0,666	84,1	0,667	83,9	0,667	84,1	0,124
105	0,663	83,5	0,662	83,6	0,661	83,1	0,662	83,5	0,234
120	0,659	83,0	0,658	83,1	0,660	83,0	0,659	83,0	0,043
135	0,653	82,2	0,652	82,3	0,655	82,4	0,653	82,3	0,074
150	0,650	81,9	0,650	82,1	0,651	81,9	0,650	81,9	0,113
165	0,648	81,6	0,649	81,9	0,649	81,6	0,649	81,6	0,186
180	0,647	81,5	0,648	81,8	0,647	81,4	0,647	81,5	0,227

Tabela 23 - Absorvâncias obtidas em função da percentagem de DPPH[•] restante, para o trans- β -farneseno 100 mM

Tempo (min.)	Réplica nº 1		Réplica nº 2		Réplica nº 3		Média A ₅₁₅	Média %DPPH restante	Desvio padrão
	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante			
0	0,794	100	0,792	100	0,795	100	0,794	100	0,000
1	0,737	92,8	0,738	93,2	0,738	92,8	0,738	92,8	0,206
15	0,722	90,9	0,725	91,5	0,723	90,9	0,723	90,9	0,348
30	0,709	89,3	0,710	89,6	0,708	89,1	0,709	89,3	0,297
45	0,703	88,5	0,701	88,5	0,702	88,3	0,702	88,5	0,129
60	0,694	87,4	0,692	87,4	0,695	87,4	0,694	87,4	0,024
75	0,690	86,9	0,691	87,2	0,690	86,8	0,690	86,9	0,238
90	0,687	86,5	0,687	86,7	0,688	86,5	0,687	86,5	0,122
105	0,679	85,5	0,687	86,7	0,680	85,5	0,680	85,5	0,703
120	0,673	84,8	0,682	86,1	0,671	84,4	0,673	84,8	0,901
135	0,670	84,4	0,672	84,8	0,670	84,3	0,670	84,4	0,304
150	0,666	83,9	0,670	84,6	0,667	83,9	0,667	83,9	0,408
165	0,665	83,8	0,665	84,0	0,664	83,5	0,665	83,8	0,221
180	0,665	83,8	0,666	84,1	0,667	83,9	0,666	83,9	0,169

Tabela 24 - Absorvâncias obtidas em função da percentagem de DPPH[•] restante, para o trans- β -farneseno 50 mM

Tempo (min.)	Réplica nº 1		Réplica nº 2		Réplica nº 3		Média A ₅₁₅	Média %DPPH restante	Desvio padrão
	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante			
0	0,794	100	0,792	100	0,795	100	0,794	100	0,000
1	0,749	94,3	0,748	94,4	0,748	94,1	0,748	94,3	0,182
15	0,736	92,7	0,738	93,2	0,737	92,7	0,737	92,7	0,278
30	0,727	91,6	0,726	91,7	0,728	91,6	0,727	91,6	0,058
45	0,716	90,2	0,715	90,3	0,714	89,8	0,715	90,2	0,245
60	0,708	89,2	0,710	89,6	0,710	89,2	0,710	89,2	0,257
75	0,700	88,2	0,701	88,5	0,700	88,1	0,700	88,2	0,240
90	0,697	87,8	0,698	88,1	0,699	87,9	0,698	87,9	0,175
105	0,690	86,9	0,691	87,2	0,690	86,8	0,690	86,9	0,238
120	0,690	86,9	0,691	87,2	0,690	86,8	0,690	86,9	0,238
135	0,690	86,9	0,690	87,1	0,690	86,8	0,690	86,9	0,167
150	0,689	86,8	0,690	87,1	0,690	86,8	0,690	86,8	0,195
165	0,689	86,8	0,690	87,1	0,690	86,8	0,690	86,8	0,195
180	0,689	86,8	0,689	87,0	0,690	86,8	0,689	86,8	0,122

Tabela 25 - Absorvâncias obtidas em função da percentagem de DPPH[•] restante, para o trans- β -farneseno 10 mM

Tempo (min.)	Réplica nº 1		Réplica nº 2		Réplica nº 3		Média A ₅₁₅	Média %DPPH restante	Desvio padrão
	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante	A ₅₁₅	% DPPH [•] restante			
0	0,794	100	0,792	100	0,795	100	0,794	100	0,000
1	0,767	96,6	0,765	96,6	0,766	96,4	0,766	96,6	0,140
15	0,761	95,8	0,762	96,2	0,763	96,0	0,762	96,0	0,187
30	0,754	95,0	0,756	95,5	0,754	94,8	0,754	95,0	0,324
45	0,748	94,2	0,749	94,6	0,748	94,1	0,748	94,2	0,252
60	0,744	93,7	0,741	93,6	0,744	93,6	0,744	93,6	0,076
75	0,740	93,2	0,740	93,4	0,741	93,2	0,740	93,2	0,133
90	0,741	93,3	0,740	93,4	0,739	93,0	0,740	93,3	0,251
105	0,740	93,2	0,740	93,4	0,739	93,0	0,740	93,2	0,239
120	0,740	93,2	0,740	93,4	0,739	93,0	0,740	93,2	0,239
135	0,740	93,2	0,739	93,3	0,739	93,0	0,739	93,2	0,180
150	0,740	93,2	0,739	93,3	0,739	93,0	0,739	93,2	0,180
165	0,739	93,1	0,739	93,3	0,739	93,0	0,739	93,1	0,179
180	0,739	93,1	0,739	93,3	0,739	93,0	0,739	93,1	0,179